



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

 Facultat de Química

PROGRAMA DE DOCTORAT
EN QUÍMICA



**DESARROLLO DE NUEVAS ESTRATEGIAS PARA EL DISEÑO DE
TÉCNICAS DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA MINIATURIZADA EN
LÍNEA: NANOPARTÍCULAS, CONTAMINACIÓN SECUNDARIA**

Tesis presentada para alcanzar el grado de Doctor en Química dentro del Programa de Doctorado en Química con Mención de Excelencia (R.D. 99/2011)

Pascual Serra Mora

Directoras

Prof^a. Dra. Pilar Campíns Falcó

Prof^a. Dra. Rosa Herráez Hernández

València, septiembre 2019

Departament de Química Analítica

Dña. Pilar Campíns Falcó, Catedrática de Universidad, y Dña. Rosa Herráez Hernández, Catedrática de Universidad, ambas del Departamento de Química Analítica de la Universitat de València,

CERTIFICAN

Que la presente memoria, titulada “Desarrollo de nuevas estrategias para el diseño de técnicas de cromatografía líquida miniaturizada en línea: nanopartículas, contaminación secundaria”, constituye la Tesis Doctoral de Pascual Serra Mora para optar al grado de Doctor en Química, y que ha sido realizada en los laboratorios del Departamento de Química Analítica de la Universitat de València, bajo su dirección y supervisión.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en València, a 13 de septiembre de 2019.

Fdo. Dra. Pilar Campíns Falcó

Directora de Tesis

Fdo. Dra. Rosa Herráez Hernández

Directora de Tesis

Esta tesis predoctoral ha sido realizada gracias a la beca predoctoral FPI (BES-2015-074030) concedida por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades.



UNIÓN EUROPEA
Fondo Social Europeo
El FSE invierte en tu futuro

*A mon pare,
qui desafortunadament ja no està
ací per acompanyar-nos: Sempre
has sigut font d'inspiració i un
exemple a seguir. Papà, gràcies
per fer-ho tot possible!*

Aquesta tesi és fruit d'anys de treball i sacrifici durant els quals m'han acompanyat diferents persones a les quals ara vull agrair la seua companyia.

En primer lloc voldria agrair aquesta tesi a les meues directores. Pilar gràcies per confiar en mi, obrir-me les portes de MINTOTA i fer possible que arribe aquest moment, eres tot un exemple de treball i perseverança. Rosa gràcies per la teua disponibilitat, dedicació i paciència, eres una font de coneixements i treballar al teu costat és un plaer.

Gràcies a Carmen i Jorge per la vostra ajuda i suggeriments. Especialment agrair a Yolanda per la seua calidesa i consells més enllà de la tesi. Vosaltres tres sou també responsables d'aquest treball.

També vull agrair a tots els companys amb qui he compartit sopars, celebracions, congressos, viatges: Maria, Rodrigo, Javier, Neus, Anabel, Lusine, Sara, Henry, Lorenzo, Ana, Adrià, Hector, Sergio i JuanLu. Gràcies per la vostra paciència i ajuda, tots vosaltres heu fet més amigable el treball al laboratori. Vull agrair especialment a Maria i Anabel (las chaticas) sense dubte dos de les persones més importants que m'ha aportat aquesta etapa. Gràcies per la vostra amistat i el temps compartit. Espere que aquesta amistat (la cordeta) dure per sempre i continuem col·leccionant bons moments i experiències.

Merci à Valérie de m'avoir permis d'effectuer mon séjour prédoctoral dans son groupe de recherche LSABM sur l'ESPCI. Malgré le peu de temps que j'ai passé là-bas, j'ai pu apprendre beaucoup de choses et enfin obtenir un capillaire complètement rempli d'un monolithe. Je tiens également à remercier Audrey, Fanny, Thomas, Stan, Khirreddine et les autres membres du groupe de leur aide et de me faire sentir chez moi.

Als meus pares i germans per ajudar-me a complir els meus objectius com a estudiant i persona. Gràcies pels sacrificis, per la comprensió, pels consells i l'estima. També vull agrair a les meues ties, tios, cosins i cosines pel seu suport i admiració que m'obliga superar-me cada dia. És un orgull tindre-vos a tots a prop i ser part d'aquesta família a la qual sempre es pot acudir. Tots vosaltres sou els responsables del que sóc ara.

A Amparo, Omar i Eli que junt amb Maria i Anabel formen part d'aquesta colla d'amics de viatges i aventures. Gràcies per fer-me disfrutar de la vida, per la vostra alegria contagiosa, pels consells, els ànims i totes les experiències viscudes.

Gracias a María del Mar por ser mi amiga y confidente, por estar siempre ahí y por compartir otras realidades que me han enseñado a relativizar y valorar las cosas realmente importantes.

A mis amigos Jonathan, Dani, Julio, Joan, Abel, Marino y Antonio, el fin de semana no podía empezar con mejor compañía.

A Mireia per qui sento una especial admiració.

A Paco i Marc, companys de carrera i amics, amb qui vaig aprendre a treballar al laboratori. Gràcies per tants anys d'amistat.

Gràcies a Cristian que malgrat haver arribat recentment i en moments complicats, ha estat incondicionalment al meu costat i el seu suport m'ha fet la vida més fàcil. No podria haver escollit millor company de vida.

A tots i totes, i també a les persones que no he nomenat però formen part de les meues vivències, espere poder tornar-vos tot allò que m'heu donat que no és poc.

Abstract

In recent years one of the most important trends in Analytical Chemistry has been the development of new analytical methodologies based on the miniaturization, simplification and automatization of the analytical process, in order to reduce the environmental impact of the analysis without compromising the sensitivity and selectivity. In this respect miniaturized liquid chromatography (LC) systems, such as capillary liquid chromatography (CapLC) and nanoliquid chromatography (NanoLC) are important achievements. These techniques are environmental friendly because the amount of material involved is limited and organic solvents, electricity and the wastes generated are lower than in conventional scale LC. In addition, CapLC and NanoLC provide an improvement of the sensitivity and even selectivity with respect to conventional LC.

On the other hand, sample treatment is one of the most important steps of analytical process; as it is usually necessary to eliminate most endogenous compounds and to concentrate analytes, which are often present at low concentrations in the sample. Sample treatment is typically the most time-consuming step of the analytical process. This is because conventional off-line sample preparation techniques generally require laborious procedures that are susceptible to produce analyte loss and contamination. In addition, most of them are difficult to automatize. Therefore, these methodologies are gradually being replaced by solid-phase microextraction (SPME), a green approach to sample preparation which minimizes solvent consumption and generation of wastes. SPME is also less time consuming and more cost effective than traditional procedures. In-tube solid-phase microextraction (IT-SPME) is an interesting alternative to other SPME techniques, because it combines miniaturization, automation and reduction of solvent consumption, and it can be also coupled to LC systems. The limited number of extraction columns available is the most important limitation of IT-SPME, particularly coupled to CapLC and NanoLC. Therefore, it is necessary to develop new sorbents for IT-SPME.

The research carried out in the course of the present thesis has been mainly focused on the development of new strategies for the implementation of IT-SPME through new configurations of coupling and the synthesis of new extractive phases or the reutilization of waste (ashes). More specifically, the research has been intended to facilitate the on-line coupling of IT-SPME to miniaturized LC equipments, as well as to develop in situ non-invasive strategies for the analysis of different pollutants and wastes. Special attention has been developed to polar compounds because of their high mobility in the environment. In some cases, the studies have been extended to their degradation products.

Therefore, this thesis is intended to improve knowledge about IT-SPME, exploring new materials as extractive phases, as well as to consolidate the coupling with miniaturized LC, especially NanoLC and others techniques amenable for in situ or non-invasive studies, and from a perspective of the Green Analytical Chemistry principles.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Cromatografía líquida miniaturizada	5
1.2 Microextracción en fase sólida en tubo.....	8
1.2.1 Configuraciones para IT-SPME.....	12
1.2.2 Acoplamiento de la IT-SPME con LC	14
1.3 Fases de extracción para IT-SPME	18
1.3.1 Columnas capilares convencionales	18
1.3.2 Nuevas fases para columnas capilares	22
1.4 Microextracción en jeringa (MEPS)	42
1.5 Cromatografía líquida en modo HILIC.....	44
1.6 Analitos estudiados.....	50
1.6.1 Pesticidas	50
1.6.1.1 Triazinas.....	52
1.6.1.2 Sulfonilureas.....	56
1.6.1.3 Compuestos organofosforados	58
1.6.1.4 Fenilureas	59
1.6.1.5 Otros pesticidas.....	60
1.6.2 Hidrocarburos aromáticos policíclicos.....	63
1.6.3 Ovoalbúmina.....	65
1.6.4 Compuestos de amonio cuaternario (QACs)	68
1.6.5 Clorofila.....	70
CAPÍTULO 2. OBJETIVOS.....	73
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA.....	85
3.1 Reactivos	87
3.2 Instrumentación:	90
3.2.1 Técnicas espectroscópicas:.....	90

3.2.1.1 Espectrofotometría UV-vis.....	90
3.2.1.2 Espectrofotometría de reflectancia difusa.....	91
3.2.1.3 Espectroscopía infrarroja	91
3.2.1.3 Fluorescencia.....	92
3.2.2 Técnicas microscópicas	93
3.2.2.1 Microscopio óptico.....	93
3.2.2.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	94
3.2.3 Técnicas cromatográficas	95
3.2.3.1 Cromatografía líquida capilar.....	95
3.2.3.2 Nanocromatografía líquida	97
3.3 Tratamiento de muestra	98
3.3.1 IT-SPME en válvula con 1 capilar	98
3.3.2 IT-SPME en válvula con 2 capilares.....	100
3.3.3 MEPS	102
3.4 Síntesis de nuevas fases para extracción.....	103
3.4.1 Inmovilización de nanotubos de carbono en las columnas TRB-5 y TRB-35.....	103
3.4.2 Columnas capilares recubiertas con un polímero de silicio	104
3.4.2 Columna capilar rellena con un monolito orgánico.....	105
3.5 Procedimientos y condiciones experimentales	106
3.5.1 Condiciones cromatográficas.....	106
3.5.2 Estudios de degradación.....	111
3.5.3 Parámetros fisicoquímicos.....	112
3.5.4 Determinación de compuestos de amonio cuaternario.....	113
3.5.5 Cenizas	115
3.6 Muestras analizadas	116
3.6.1 Aguas.....	117
3.6.2 Suelos.....	118

3.6.3 Estruvita	118
3.6.4 Biota	119
3.6.5 Alimentos	119
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	121
4.1 IT-SPME acoplada en línea a cromatografía líquida capilar	123
4.1.1 Fases comerciales y modificadas	124
4.1.1.1 Determinación de biocidas en agua por IT-SPME-CapLC-DAD. Estimación de la huella de carbono	124
4.1.1.2 Análisis de triazinas y sus productos de degradación en agua por IT-SPME-CapLC-DAD	134
4.1.1.3 Evaluación de capilares recubiertos con PDMS modificado con c-CNTs para IT-SPME-CapLC-DAD	150
4.1.2. Fases sintetizadas	160
4.1.2.1 Estudio de la extracción en línea de contaminantes polares por IT-SPME empleando fases con nanopartículas de sílice	161
4.1.2.2. Estudio de la capacidad de extracción de la fase TEOS-MTEOS con NPs de SiO ₂ y TiO ₂ para la determinación de compuestos aromáticos.....	171
4.2 IT-SPME acoplada a nanocromatografía de líquidos	179
4.2.1 Configuraciones	180
4.2.2 Estudio de nuevas fases	185
4.2.2.1 IT-SPME-NanoLC: aplicación a la determinación de triazinas polares intactas y degradadas en muestras de agua y de estruvita recuperada	186
4.2.2.2 Estudio de la capacidad de extracción de la fase TEOS-MTEOS dopada con nanopartículas de SiO ₂ y TiO ₂ para la extracción y preconcentración de diferentes pesticidas.....	196
4.2.2.3 Capilares recubiertos con TEOS-MTEOS dopado con NPs metálicas y de óxidos metálicos para la extracción de triazinas y sulfonilureas	200

4.2.2.4 Estudio de la degradación de tribenurón-metil en muestras de aguas ambientales.....	215
4.2.2.5 Medida no invasiva del contenido en clorofila a para la evaluación de la influencia de la acción de pesticidas en plantas	226
4.2.2.6 Estudio de la capacidad de extracción de TEOS-MTEOS modificado con NPs de CuO en HILIC-IT-SPME-NanoLC-DAD para la determinación de triptófano y tirosina	241
4.2.2.7 Synthesis and characterization of VPBA-DVB boronate affinity monolith as extractive phase for IT-SPME-NanoLC	252
4.3 SPME fuera de línea	261
4.3.1. IT-SPME para la determinación de QACs.....	262
4.3.2 Utilización de cenizas de café como sorbente para MEPS	280
CHAPTER 5. GENERAL CONCLUSIONS	289
REFERENCIAS.....	297
ANEXOS	343
A.1 Abreviaturas	345
A.2 Listado de Figuras	347
A.3 Listado de Tablas	355
A.4 contribucion del doctorando en las publicaciones.....	359

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

El término Química Verde (QV) fue definido en 1991 por Anasta y Warner (Anasta & Warner, 1991), quienes propusieron una visión más responsable de la Química disminuyendo el uso y la generación de sustancias químicas peligrosas en el diseño, producción y aplicación de productos químicos. Esta visión persigue reducir la toxicidad de los residuos generados y la exposición a los mismos, y por tanto mejorar la seguridad. Además, en los principios de la QV, Anasta y Warner inciden en los efectos ambientales de los procesos químicos, y proponen la utilización de procedimientos que impliquen una disminución del consumo eléctrico.

Tiempo después, Gałuszka y colaboradores (Gałuszka, Migaszewski & Namieśnik, 2013) extrapolan y adaptan los principios de la QV a la Química Analítica definiendo los 12 principios de la Química Analítica Verde (QAV):

- 1) Priorizar técnicas analíticas que permitan el análisis directo de la muestra
- 2) Procesar la mínima cantidad y número de muestras
- 3) Favorecer los procedimientos in-situ
- 4) Seleccionar procesos y operaciones que reduzcan el uso de reactivos y el derroche energético
- 5) Priorizar el uso de métodos automáticos y miniaturizados
- 6) Eliminar la derivatización
- 7) Disminuir la cantidad y gestionar correctamente los residuos generados durante el análisis
- 8) Priorizar métodos multianalito o multiparámetro
- 9) Reducir el consumo eléctrico
- 10) Favorecer el uso de reactivos obtenidos de fuente renovables
- 11) Eliminar o reemplazar el uso de reactivos tóxicos
- 12) Incrementar la seguridad del operario

En la actualidad, estos principios rigen la nueva visión de la Química Analítica, que pretende dar respuesta a las necesidades sociales e industriales con el menor impacto ambiental, y sin perjudicar la salud de los operarios y de la sociedad en su conjunto.

A pesar de que el análisis químico es un proceso complejo que implica diferentes etapas dependientes unas de otras, se pueden establecer seis aspectos críticos sobre los que trabajar para desarrollar procedimientos analíticos más acordes con la QAV (Figura 1) (Ballester-Caudet et al., 2019).

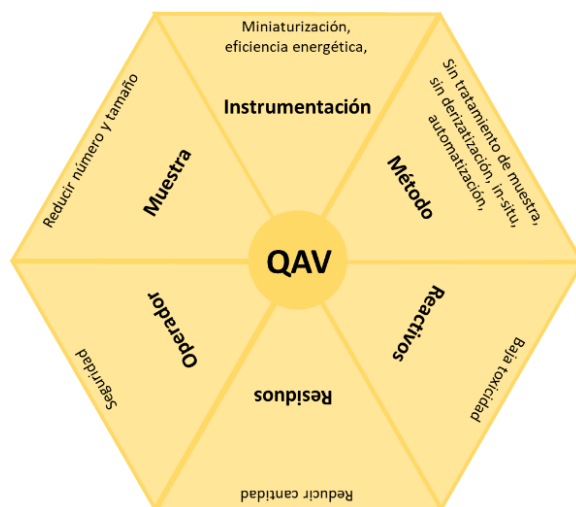


Figura 1. Aspectos más importantes de los procedimientos analíticos según la QAV.

Teniendo en cuenta los aspectos reflejados en la Figura 1, es de gran interés el uso de técnicas instrumentales miniaturizadas puesto que se reduce el consumo de recursos sin perder la calidad de los parámetros analíticos, pudiendo incluso mejorarse. Por otro lado, el uso de técnicas de extracción miniaturizadas con pocas etapas o bien de procedimientos de extracción en línea supone una disminución del impacto ambiental del procedimiento analítico, puesto que se reduce entre otros el tiempo de análisis, el consumo de disolventes orgánicos y los residuos generados.

Por todo ello, considerando la visión actual de una Química Analítica más sostenible y respetuosa con el medio ambiente sin perjudicar los parámetros analíticos, resulta de gran interés el uso de técnicas de microextracción, preferiblemente en línea, acopladas a técnicas instrumentales miniaturizadas.

1.1 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA MINIATURIZADA

La miniaturización de los sistemas de cromatografía líquida (LC) comenzó en 1967, cuando Horváth y colaboradores propusieron un procedimiento analítico empleando LC convencional para separar ribonucleótidos con una columna analítica de 1 mm de diámetro interno (d.i.), frente a las columnas de 2,1 mm utilizadas hasta el momento (Horváth et al., 1967). Una década después, se empleó una columna particulada de politetrafluoroetileno (PTFE) de 1 mm de d.i. y 15 cm de longitud para separar diferentes hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) (Ishii et al., 1977). Posteriormente se publicaron diferentes trabajos que emplearon para la separación columnas analíticas de 1 mm de d.i. rellenas con partículas de diferentes tamaños y recubiertas por diferentes materiales (Scott & Kucera, 1979). En la actualidad, se pueden encontrar columnas comerciales para LC que van desde 2.1 mm a 75 μ m de d.i. (Nazario, Silva, Franco & Lanças, 2015, Campíns-Falcó, Herráez-Hernández, Serra-Mora, 2018).

La reducción del d.i. de la columna analítica está de acuerdo con los principios de la QAV, concretamente con los puntos 4 y 7, puesto que esta reducción implica una disminución del flujo de fase móvil, reduciéndose el consumo de disolventes y como consecuencia la cantidad de residuos generada es menor. Además, la disminución del flujo de fase móvil hace posible nuevos mecanismos de interacción entre ésta y los analitos, conduciendo a una mejora en la selectividad (Nazario et al., 2015). La reducción del d.i. de la columna analítica también supone una disminución del volumen de muestra requerido (principio 2 de la QAV).

Por otro lado, al utilizar columnas analíticas con menor d.i. se reduce la dispersión de los analitos dentro de las mismas, disminuyendo la dilución cromatográfica y mejorándose la relación señal-ruido, lo que se traduce en un incremento significativo de la sensibilidad respecto a la LC convencional.

Otro parámetro implicado en la miniaturización de la LC es el tamaño de partícula de la fase estacionaria. En las últimas décadas el diámetro de las partículas utilizadas como fase estacionaria se ha ido reduciendo obteniéndose una mayor eficacia, la cual ha ido progresivamente acercándose a la obtenida en cromatografía de gases (GC) (Šesták, Moravcová & Kahle, 2015).

Los sistemas de LC miniaturizada se pueden clasificar según el d.i. de la columna analítica o el flujo de la fase móvil, teniendo en cuenta que ambas variables son dependientes la una de la otra. Pero a causa de la rapidez con la que se han desarrollado y evolucionado los sistemas de LC miniaturizada, existe cierta confusión y controversia en la nomenclatura utilizada para designar a estos sistemas. Por ejemplo, en 1995, Jinno y colaboradores aplicaban el término “nano” para describir una columna de 530 μm de d.i. (Jinno et al., 1995), y años después en la misma revista, se utiliza el prefijo “capilar” para referirse a un diámetro de columna de 300 μm (Zhu, Zhu & Lee, 2001). En la Tabla 1 se muestra la nomenclatura aceptada en la actualidad según las dimensiones cromatográficas (Campíns-Falcó et al., 2018). Cabe destacar que a medida que se miniaturizaban las columnas analíticas ha sido necesario miniaturizar el resto de la instrumentación que forma parte del sistema cromatográfico como la bomba o el detector.

Tabla 1. Clasificación general de sistemas de LC según las dimensiones de la columna y el flujo de fase móvil.

Tipo LC	d. i. columna (mm)	Flujo fase móvil ($\mu\text{L min}^{-1}$)
Preparativa	> 10	> 5000
Convencional	4.0 - 4.6	2000
Narrow bore	2.1	500
Microbore	1	100
Capilar	0.1 – 0.5	1 – 20
Nano	≤ 0.1	≤ 1

El incremento de fases estacionarias de diferente naturaleza en columnas analíticas de menor diámetro, junto con el progreso en el desarrollo de instrumentación miniaturizada, que se ha hecho más robusta, permitirá que la cromatografía líquida capilar (CapLC) y la nanocromatografía líquida (NanoLC) se conviertan en herramientas extremadamente efectivas y polivalentes para el análisis de gran variedad de analitos en multitud de matrices. Todo ello junto con un menor coste económico e impacto ambiental que los procedimientos equivalentes que hacen uso de la LC convencional. En la Tabla 2 se muestran, a modo de ejemplo, diferentes procedimientos analíticos descritos recientemente en la literatura que emplean para la separación sistemas de LC miniaturizada.

Tabla 2. Ejemplos de aplicación de diferentes procedimientos basados en LC miniaturizada.

Analitos	Matriz	Sistema LC	Columna analítica	Referencia
Parabenos	Cosméticos, alimentos y medicamentos	CapLC-UV	Zorbax SB -C18	Chen et al., 2018
Aniones	Agua potable y ambiental	CapLC-UV	Waters IC-Pak	Murray et al., 2018
Nitrato y nitrito	Verduras	CapLC-UV	VIM-EDMA	Lin, Hsu & Fush, 2019
Biocidas	Agua	CapLC-DAD	Zorbax SB-C18	Prieto-Blanco, et al., 2016
Antidepresivos	Plasma	CapLC-MS	PS-DVB	Murtada, et al., 2018
Cannabiol, cannabidiol y tetrahidrocannabiol	Residuos	NanoLC-DAD	Zorbax SB-C18	Jornet-Martínez et al., 2018
Metabolitos de anfetaminas	Orina	NanoLC-MS	TF Accuore C18 Viper	Caspar et al., 2018
PAHs	Agua	NanoLC-UV	c-CNTs- BMA-EGDMA	Al-Rifai et al., 2018
Pesticidas	Alimentos	NanoLC-MS	C18 PepMap®	Moreno-González et al., 2017

DAD: fila de diodos, MS: espectrometría de masas, UV,: absorción ultravioleta, VIM-EDMA: poli(vinilimidazol-co-dimetacrilato de etilenglicol), PS-DVB: poli(estireno-co-divinilbenceno), BMA-EGDMA: poli(bencil polimetacrilato-co- dimetacrilato de etilenglicol).

1.2 MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA EN TUBO

En la mayoría de los procedimientos analíticos se requiere una etapa de preparación de la muestra con el fin de eliminar posibles interferencias y preconcentrar los analitos que se encuentran a bajas concentraciones, además de para adecuar la disolución de medida a las condiciones del instrumento a utilizar. Es decir, con el tratamiento de muestra se persigue fundamentalmente incrementar la selectividad y la sensibilidad del procedimiento analítico (Moliner-Martínez, Herráez-Hernández, Verdú-Andrés, Molins-Legua & Campíns-Falcó, 2015; Queiroz, Souza & Marchioni, 2019).

Las técnicas de extracción convencionales requieren de gran cantidad de etapas para extraer, purificar, concentrar y/o derivatizar los analitos, siendo procedimientos laboriosos y tediosos, con un elevado coste económico y de tiempo, lo que estaría en contra de los principios de la QAV. Se estima que alrededor del 65 % de las muestras analizadas requieren de tres o más operaciones antes de obtener una señal analítica adecuada. Como consecuencia de todos estos procesos, la etapa del tratamiento de muestra es responsable de, al menos, el 30 % del error total del análisis (Rayner, 2016).

Con el fin de reducir el mencionado error, en las últimas décadas muchas de las contribuciones científicas en el campo de la Química Analítica se han centrado en el desarrollo de nuevas técnicas de tratamiento de muestra, que a su vez sean más respetuosas con el medio ambiente, de acuerdo con los principios de la QAV.

La mayoría de estas nuevas técnicas, denominadas técnicas de microextracción, suponen una disminución de los materiales necesarios para llevar a cabo las diferentes operaciones que componen el tratamiento de muestra. Así, se reduce el consumo de muestra, de fase de extracción, de disolventes orgánicos, de reactivos y de energía, generándose menor cantidad de residuos. Además, se busca la posibilidad de automatizarlas y acoplarlas directamente a los sistemas cromatográficos.

Pawliszyn y colaboradores propusieron en 1990 por primera vez la denominada microextracción en fase sólida (SPME), basada en sumergir en la disolución de medida durante un tiempo determinado, una fibra recubierta con la fase extractante. Los analitos son desorbidos posteriormente empleando un disolvente orgánico o térmicamente si se utiliza GC para la separación. Con esta técnica se logra miniaturizar la etapa de preparación de muestra aunando el muestreo, la extracción y la preconcentración en una única etapa (Arthur & Pawliszyn, 1990). Años después, en 1997, Eisert y Pawliszyn proponen la microextracción en fase sólida en tubo (IT-SPME), con la finalidad de evitar los problemas asociados con la fragilidad de las fibras y los largos tiempos de desorción (Eisert & Pawliszyn, 1997). Esta técnica, que emplea columnas capilares para la extracción, presenta gran interés desde el punto de vista de la QAV puesto que además de las ventajas de la SPME, es automatizable y se puede acoplar en línea muy fácilmente a LC.

La IT-SPME clásica utiliza un segmento de capilar de sílice fundida con las paredes interiores recubiertas por una capa del material sorbente que actúa como fase de extracción. Inicialmente se utilizaron segmentos de columnas comerciales de GC (Figura 2A). Cuando la muestra pasa a través del capilar se produce la adsorción de los analitos en la fase de extracción. Seguidamente, los analitos retenidos son desorbidos haciendo pasar por el capilar un disolvente orgánico, y éste se reserva para ser posteriormente procesado (fuera de línea). Otra opción consiste en desorber los analitos y transferirlos simultáneamente al sistema de separación y/o detección (en línea). Normalmente, en este último caso es la propia fase móvil del sistema de LC la que se emplea para desorber los analitos y trasportarlos a través del sistema cromatográfico.

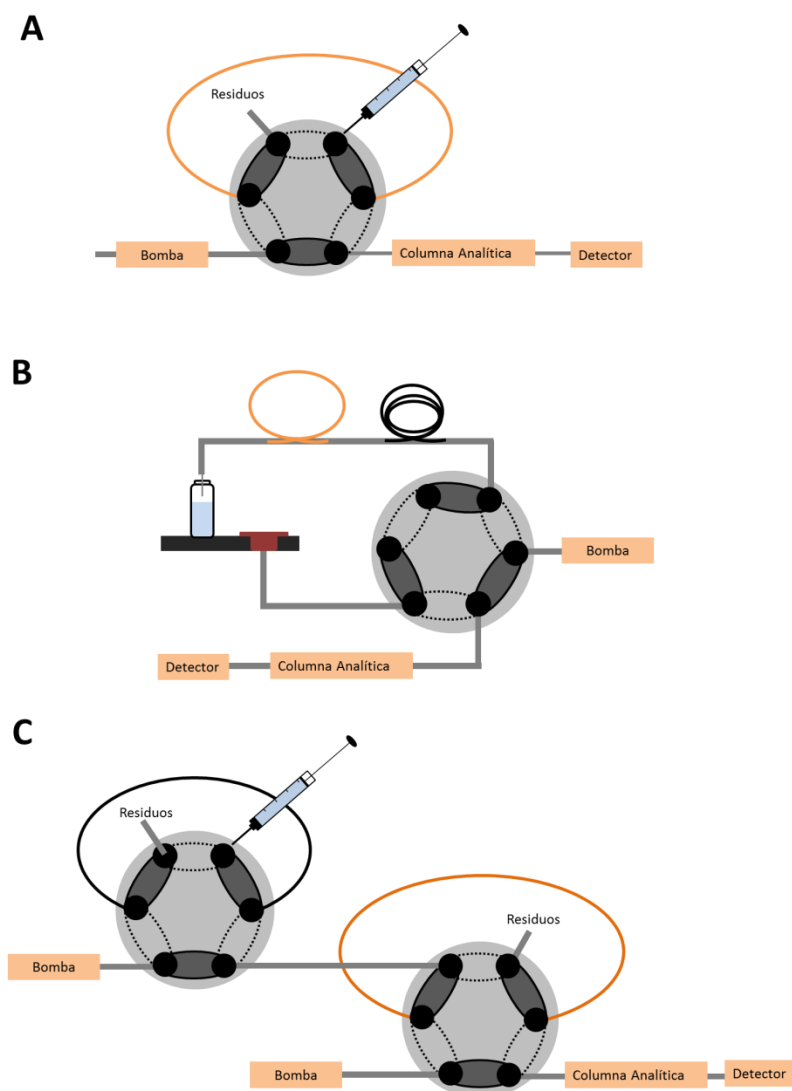


Figura 2. Representación esquemática de las configuraciones más usadas en IT-SPME-LC: A) en válvula con una bomba, B) carga/expulsión y C) en válvula con dos bombas. En naranja se muestra el capilar de extracción.

A pesar de que el uso de una columna capilar con las paredes internas recubiertas por el material sorbente (Figura 3A) es la opción más utilizada como columna de extracción en IT-SPME, también se han utilizado capilares rellenos con partículas recubiertas del material sorbente (Figura 3C), columnas rellenas con fibras de extracción similares a las utilizadas en SPME (Figura 3D) o capilares rellenos con un material monolítico que actúa como sorbente (Figura 3B).

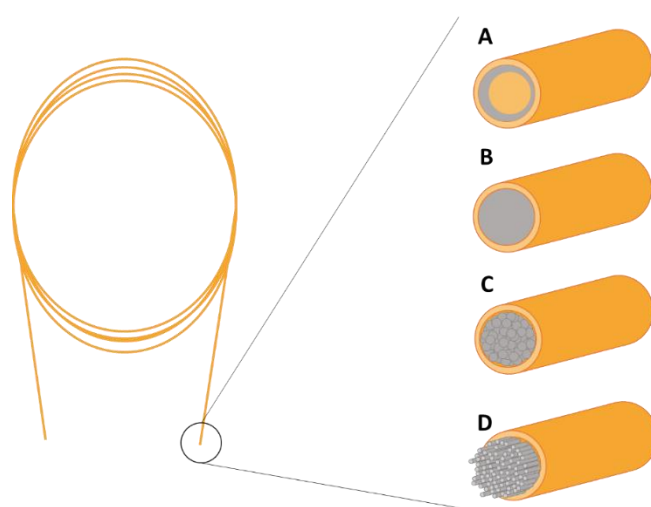


Figura 3. Representación esquemática de los diferentes tipos de columnas de extracción utilizadas en IT-SPME. A) recubierta, B) monolítica, C) particulada y D) con fibras.

Las columnas de extracción particuladas (Figura 3C), consisten en capilares rellenos con partículas de sílice las cuales están recubiertas con otro material que presenta una mayor afinidad y selectividad por el analito. Las columnas son por tanto similares a las columnas analíticas particuladas.

Dos de las opciones para IT-SPME más utilizadas son el recubrimiento de las paredes internas del capilar con un material polimérico (Figura 3A) y la utilización de columnas monolíticas (Figura 3B). Desde que se sintetizaron por primera vez las columnas capilares monolíticas, se han desarrollado gran cantidad de procedimientos analíticos que demuestran el potencial de este tipo de materiales como fase de extracción para IT-SPME (Moliner et al., 2015). No obstante, la primera de las dos opciones resulta de mayor interés a causa de su relativa simplicidad, además de generar un aumento poco significativo de la presión cuando se acopla a LC.

Las columnas de extracción en fibra (fibra-IT-SPME), (Figura 3d) fueron propuestas por primera vez por Saito y colaboradores (Saito, Kawazoe, Jinno & Hayashida, 2000). En esta técnica la extracción es llevada a cabo empleando un capilar relleno longitudinalmente con finas fibras de extracción, similares a las utilizadas en SPME. Dado que estas fibras están dispuestas en paralelo a las paredes del capilar, se crean canales coaxiales estrechos dentro del capilar que reducen la presión dentro del sistema durante la extracción y la desorción. Además, el volumen vacío entre los capilares es menor, mientras que el área superficial es más elevada (Costa-Queiroz et al., 2019).

1.2.1 Configuraciones para IT-SPME

A pesar que la IT-SPME puede utilizarse fuera de línea, la principal ventaja de esta técnica frente al resto de procedimientos de SPME radica en la posibilidad de combinar en línea la etapa de tratamiento de muestra con la separación cromatográfica y la detección de los analitos. Existen dos tipos de configuraciones que permiten el acoplamiento de IT-SPME con LC, denominados carga/expulsión y en válvula. Ambos modos de trabajo requieren de una configuración específica y diferente nivel de instrumentación.

En la configuración carga/expulsión (draw/eject), el capilar que contiene la fase de extracción se sitúa entre la aguja y el loop de un inyector programable (Figura 2B). Para la extracción de los analitos se hace circular repetidamente la muestra durante un determinado número de ciclos a través del capilar de extracción hasta que se llega al equilibrio, requiriéndose en la mayoría de los casos entre 25 y 30 ciclos (Moliner-Martínez, 2015; Cháfer-Pericás, Campíns-Falcó & Prieto-Blanco, 2008). No obstante, en pocas ocasiones se llega al equilibrio, puesto que los analitos son parcialmente desorbidos con cada ciclo de carga de muestra. Después de la extracción, los analitos son desorbidos y transferidos a la columna analítica empleando un disolvente adecuado. Esta configuración requiere poco volumen de muestra, y por tanto es especialmente adecuada para el análisis de muestras biológicas ya que normalmente se dispone de un volumen limitado de muestra (Queiroz et al., 2019).

En la configuración denominada IT-SPME en-válvula, el loop de la válvula de inyección se sustituye por una columna capilar que contiene la fase de extracción, de manera que al pasar una única vez un volumen de muestra (muy superior al volumen del capilar), una fracción de los analitos quedan retenidos en la fase de extracción. Seguidamente, los analitos son desorbidos pasando un volumen conocido de disolvente (fuera de línea) o con la propia fase móvil (en línea).

En la Figura 2A se muestra un diagrama del sistema más sencillo de IT-SPME en-válvula acoplado a LC. Este sistema está compuesto por una válvula manual de seis puertos y la bomba del sistema cromatográfico. Con la válvula en posición de carga se procesa un volumen de muestra conocido, de manera que la muestra pasa por el capilar que contiene la fase de extracción y los analitos quedan retenidos. Seguidamente, la válvula se gira a la posición de inyección de forma que cuando la fase móvil pasa por el capilar de extracción desorbe los analitos previamente retenidos y los transporta hacia la columna analítica.

En la literatura se pueden encontrar descritos otros montajes que requieren más instrumentación con objetivos diversos. Por ejemplo, González-Fuenzalida, López-García, Moliner-Martínez & Campíns-Falcó, 2016 describen un montaje en-válvula compuesto por 2 válvulas y 2 bombas (Figura 2C). La utilización de dos bombas binarias permite que el flujo de trabajo sea diferente para la etapa de extracción y para la etapa de separación, es decir, se pueden acoplar dos sistemas de diferente dimensión. En el citado caso se acoplaron CapLC y NanoLC.

A pesar que las recuperaciones absolutas en IT-SPME son bajas, la sensibilidad requerida se puede alcanzar procesando volúmenes de muestra suficientemente grandes (del orden de mL) hasta que la cantidad de analito retenida sea adecuada para obtener una respuesta analítica satisfactoria. De hecho, la eficiencia de la extracción obtenida con IT-SPME depende básicamente de la afinidad de los analitos por la fase de extracción. Por ello, de todos los parámetros que afectan a la extracción, uno de los más importantes es la naturaleza de la fase de extracción. No obstante, otros parámetros como el volumen de muestra, el pH, el espesor de la fase de extracción, la longitud y el d.i. del capilar o el disolvente de extracción, deben ser optimizados para conseguir las mayores prestaciones en términos de sensibilidad, selectividad y rapidez.

Por otra parte, las dimensiones del sistema cromatográfico al que se acopla la IT-SPME también influyen significativamente en la sensibilidad. Por ello, en los últimos años el desarrollo de IT-SPME ha evolucionado en dos direcciones (Moliner-Martínez et al., 2015; Campíns-Falcó et al., 2018):

- 1) Acoplamiento de IT-SPME con nuevos sistemas cromatográficos como UHPLC o técnicas miniaturizadas (CapLC y NanoLC).
- 2) Desarrollo de nuevas fases de extracción que permitan nuevas interacciones con los analitos.

1.2.2 Acoplamiento de la IT-SPME con LC

En la actualidad, el acoplamiento entre IT-SPME y LC está en desarrollo. En la bibliografía se pueden encontrar descritos procedimientos basados en IT-SPME-LC que emplean detectores de absorción UV-vis, de fluorescencia o de espectroscopia de masas (Fernández-Amado, Prieto-Blanco, López-Mahía, Muniategui-Lorenzo & Prada-Rodríguez, 2017, Moliner-Martínez et al., 2015), para el análisis de muestras ambientales, alimentarias, biológicas, industriales o forenses.

Además, este acoplamiento también permite simplificar y miniaturizar la etapa de derivatización de los analitos. Por ejemplo, Campíns-Falcó y colaboradores (Campíns-Falcó, Herráez-Hernández, Verdú-Andrés, Cháfer-Pericás, 2009) realizaron la derivatización de aminas alifáticas en línea empleando IT-SPME en-válvula acoplada a LC. Para ello en primer lugar se hacía circular por el capilar de extracción una disolución del agente derivatizante que quedaba absorbido en la fase extractante. Seguidamente, se pasaba la muestra con los analitos, los cuales reaccionaban con el agente derivatizante previamente retenido. Transcurrido el tiempo de reacción, se cambiaba la posición de la válvula y la fase móvil desorbía el compuesto derivatizado formado y lo transportaba hasta la columna analítica.

Respecto al acoplamiento de IT-SPME con métodos cromatográficos miniaturizados, el grupo de investigación “Miniaturización y Métodos Totales de Análisis” (MINTOTA) donde se desarrolla la presente tesis, se ha especializado en el acoplamiento de IT-SPME a sistemas de LC, contribuyendo especialmente al desarrollo y consolidación del acoplamiento con técnicas de LC miniaturizadas como CapLC y NanoLC. En la actualidad, el acoplamiento IT-SPME-CapLC está suficientemente resuelto, encontrándose en la literatura distintas configuraciones aplicadas a los diferentes campos de análisis tales como medioambiental, alimentario, biológico, industrial y forense (Moliner et al., 2015; Argente-García, Moliner-Martínez, López-García, Campíns-Falcó & Herráez-Hernández, 2016; Hakobyan et al., 2018; Prieto-Blanco et al., 2016; Hakobyan, 2018; Argente-García, Hakobyan, Guillem & Campíns-Falcó, 2019).

Por contra, actualmente el acoplamiento de IT-SPME con NanoLC requiere nuevos estudios que ayuden a entender y demostrar las bondades y posibilidades de este acoplamiento. Consciente de esta necesidad, el grupo MINTOTA ha estudiado en los últimos años el acoplamiento IT-SPME-NanoLC y su aplicación al análisis de diferentes analitos como diclofenaco, cannabis o compuestos con grupos carbonilo (González-Fuenzalida et al., 2016; Jornet-Martínez et al., 2018; Prieto-Blanco, Peñafiel-Barba, Moliner-Martínez & Campíns-Falcó, 2019). Precisamente en esta línea se enmarca parte de la presente tesis.

En la Figura 4 se muestran las longitudes y los d.i. de los capilares utilizados para extracción en procedimientos de IT-SPME acoplados a LC propuestos recientemente. El d.i. óptimo depende del método cromatográfico al que se encuentre acoplado, mientras que la longitud no es un parámetro crítico, aunque sí afecta a la capacidad de extracción y a la dispersión de los analitos dentro del sistema cromatográfico, fenómeno que está íntimamente relacionado con la forma de los picos.

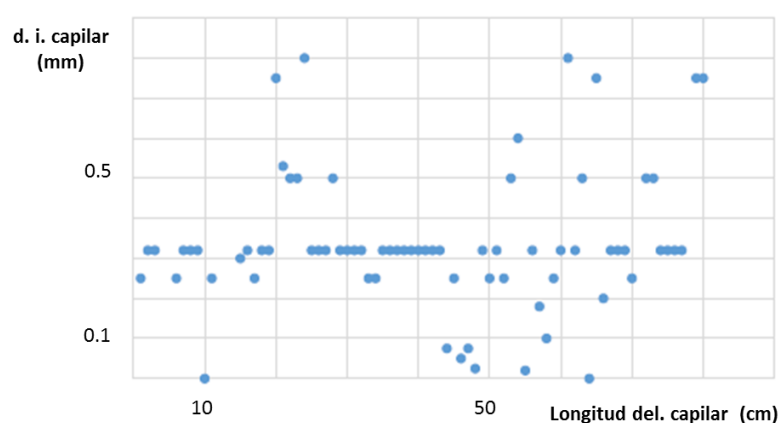


Figura 4. Dimensiones de los sistemas de IT-SPME en válvula descritos en la literatura (d.i. vs longitud).

El acoplamiento en línea de IT-SPME con LC resulta atractivo puesto que en general se obtiene una elevada sensibilidad con ausencia de efecto matriz. Además, como se puede observar en la Figura 5, los tiempos de análisis no son largos, ya que la mayoría de procedimientos requieren menos de 30 min. Además, el impacto ambiental de la IT-SPME ha sido cuantificado, siendo esta técnica más respetuosa con el medio ambiente ya que posee menor huella de carbono (Ballester-Caudet et al., 2019). La huella de carbono de la IT-SPME depende básicamente del montaje empleado. En la Tabla 3, se muestran la huella de carbono de diferentes configuraciones de la IT-SPME acopladas al mismo sistema de LC empleando un detector DAD, y considerando que el analito se eluye a los 10 min y un factor de emisiones de 0.247 Kg CO₂/KWh (Jiménez, De la Cruz, Carballo & Doménech, 2011).

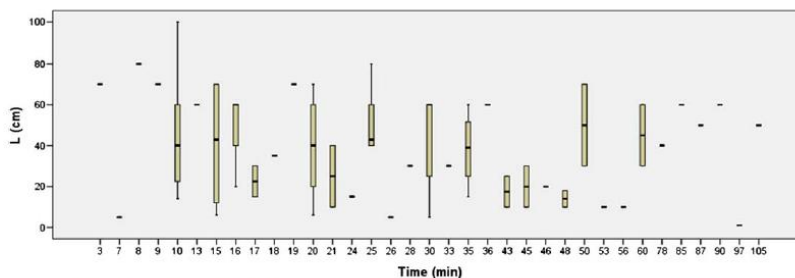


Figure 5 Influence of the capillary length in the time of the sample processing for procedures reported in Table 1.

Figura 5. Influencia de la longitud del capilar en el tiempo de procesado de la muestra, para procedimientos descritos en la literatura.

Tabla 3. Huella de carbono estimada para las diferentes configuraciones de IT-SPME combinadas con el mismo sistema de LC y detector DAD.

Configuración IT-SPME	Huella de carbono (Kg CO ₂ eq)
En válvula	
Inyección manual - una bomba	1.1
Inyección automática - una bomba	1.8
Inyección automática - dos bomba	3.0
Carga-expulsión	
Sin bomba de lavado	1.8
Con bomba de lavado	3.0

Como se puede observar en la Tabla 3, existen diferencias significativas según la configuración de IT-SPME. Estas diferencias se pueden atribuir a un mayor consumo eléctrico debido, por ejemplo, al uso de bombas auxiliares. Cabe mencionar que el uso de un detector de espectrometría de masas incrementa considerablemente el impacto ambiental respecto de un detector DAD, estimado en un mínimo de 8 Kg CO₂ eq.

1.3 FASES DE EXTRACCIÓN PARA IT-SPME

Como se ha mencionado anteriormente, en IT-SPME la naturaleza de la fase de extracción es una variable a tener en cuenta, ya que influye significativamente en la capacidad de interaccionar con los analitos, y por tanto en la preconcentración, lo que a su vez determina la sensibilidad del procedimiento analítico. Es decir, la naturaleza de la fase de extracción está directamente relacionada con la sensibilidad del procedimiento.

Se han empleado mayoritariamente como fase de extracción columnas capilares de GC o bien columnas capilares cuya fase de extracción se sintetiza específicamente para cada aplicación. Además, éstas se pueden modificar inmovilizando diferentes materiales como nanomateriales, compuestos metal-orgánico estructurados (MOFs), líquidos iónicos o inmunosorbentes. En los siguientes apartados se enumeran y describen las principales fases de extracción propuestas para incrementar las prestaciones de la IT-SPME.

1.3.1 Columnas capilares convencionales

Tradicionalmente, se han utilizado segmentos de columnas capilares comerciales de GC como columnas de extracción para IT-SPME. Estas columnas están recubiertas por un material polimérico de carbono o silicio que a su vez puede estar modificado con otras moléculas. De la gran variedad de columnas que existen en el mercado, las columnas basadas en polidimetilsiloxano (PDMS) son las más utilizadas para IT-SPME debido a su marcado carácter hidrofóbico, ya que su estructura consiste en cadenas flexibles de $\text{Si-O}(\text{CH}_3)_2$; por tanto, este material no adsorbe los disolventes hidrofílicos con los que entra en contacto. En estas condiciones, se produce la adsorción en el PDMS de los compuestos hidrofóbicos presenten en la muestra. Por ello, el PDMS es una fase idónea para IT-SPME acoplada a LC en fase reversa. Además, este polímero de la familia de las siliconas es transparente, no es tóxico ni bioacumulable y es inerte para la mayoría de las sustancias químicas (Jornet-Martínez et al., 2016).

En la literatura se pueden encontrar multitud de procedimientos que emplean columnas de PDMS modificadas con diferentes porcentajes de grupos difenilo para el análisis de contaminantes ambientales (Muñoz-Ortuño et al., 2014; Jornet-Martínez, Muñoz-Ortuño, Moliner-Martínez, Herráez-Hernández & Campíns-Falcó, 2014), restos de medicamentos, (Hakobyan et al., 2018), productos industriales (Prieto-Blanco et al., 2016), restos de interés toxicológico y/o forense (Jornet-Martínez et al., 2018; Argente-García et al., 2019) o para la caracterización de nanopartículas (González-Fuenzalida et al., 2016). Al modificar el polímero de silicio con grupos difenilo se disminuye ligeramente la hidrofobicidad de la fase extractante, a la vez que se añaden grupos aromáticos que permiten establecer nuevas interacciones de tipo π - π con los analitos, mejorando la retención de éstos (Argente-García, et al., 2019). En la literatura, aunque en menor medida, también se pueden encontrar procedimientos que utilizan como capilar de extracción columnas comerciales de GC basadas en otros derivados de silicio como cianopropilmetilsilicona o dimetilsiloxano (Silva, Lança, & Queiroz, 2008; Kataoka, Mizuno, Oda & Saito, 2016).

Respecto a las columnas comerciales recubiertas con otros materiales poliméricos, las más utilizadas se basan en la utilización de un sorbente de tipo divinilbenceno (Supel-Q PLOT) o carbón molecular (Carboxen 1006). Ambas columnas se han utilizado como fase de extracción para la determinación de compuestos apolares en matrices ambientales, alimentarias o biológicas (Fernández-Amado et al., 2017; Melo, Queiroz & Queiroz, 2011; Ishizaki, Uemura & Kataoka, 2017; Mizuno & Kataoka, 2015). No obstante, algunos autores han demostrado la utilidad de estas fases en la determinación de compuestos relativamente polares. Por ejemplo, Inukai y colaboradores utilizaron una columna capilar comercial Carboxen 1006 para determinar nicotina y cotinina en muestras de pelo de fumadores (Inukai, Kaji & Kataoka, 2018)

Entre las diferentes columnas comerciales, la fase CP-Pora PLOT amines presenta mayor eficiencia de extracción para los compuestos relativamente polares, puesto que contiene grupos amino que pueden establecer interacciones de tipo dipolo-dipolo, puentes de hidrógeno o mediante intercambio iónico (Kataoka, Itano, Ishizaki & Saito, 2009).

En la Tabla 4 se muestran a modo de ejemplo diferentes métodos de IT-SPME acoplada a LC que emplean como fase de extracción columnas capilares comerciales de GC.

Tabla 4. Ejemplos de aplicación de diferentes procedimientos basados en sistemas de LC miniaturizada con columnas de GC para IT-SPME.

Analito	Sistema	Muestra	Fase se extracción	Referencia
Meropenem	CapLC-DAD	Tubo endotraqueal	TRB-35	Hakobyan et al., 2018
Cannabidol, Cannabinol y THC	NanoLC-DAD	Restos de planta	TRB-5	Jornet-Martínez et al., 2018
DPA	CapLC-DAD	Residuos de disparos	TRB-35	Argente-García et al., 2019
PAHs	LC-FD	Agua de lluvia	TRB-5	Fernández-Amado, et al., 2017
NPs de Ag	CapLC-DAD	Agua	TRB-35	González-Fuenzalida et al., 2016
Biomarcadores	LC-MS/MS	Orina	CP-Sil 19CB PDMS, CP-Wax, carboxen y Supel Q-PLOT	Saito, Hamano & Kataoka, 2018
Melatonina	LC-MS	Saliva	CP-Sil 19CB PDMS, CP-Wax, carboxen y Supel Q-PLOT	Ishizaki et al., 2017
Antidepresivos	LC-UV	Plasma	CP-Sil 19CB	Silva et al., 2008
Ftalatos	LC-MS	Agua	Supel-Q PLOT	Cheng & Chang, 2016
Nicotina y alcaloides	LC-MS	Orina	Carboxen Pora PLOT amine	Kataoka et al., 2009
PFOA y PFOS	LC-MS	Agua de río	Pora PLOT amine	Saito, Uemura, Ishizaki & Kataota, 2010

THC: tetrahidrocannabinol, CP-Sil 19CB: 14 % de cianopropilfenilmetilsilicona,

PFOA: ácido perfluorooctanoico, PFOS: sulfonato de perfluorooctano

En esta tesis se han empleado diferentes columnas comerciales como fase de extracción para IT-SPME para la determinación de contaminantes ambientales como PAHs, triazinas o sulfonilureas. Una de las columnas comerciales de GC más utilizadas en esta tesis consiste en un capilar de sílice fundida recubierto de PDMS modificado con diferentes porcentajes de grupos difenilo (TRB-5, TRB-20, TRB-35 y TRB-50 con un 5, 20, 35 y 50 % de grupos difenilo, respectivamente).

También se han utilizado columnas comerciales Carbowax recubiertas de polietilenglicol (PEG) y las columnas FFAP recubiertas de PEG modificado con grupos nitrotereftálico, así como columnas de poliestireno-divinilbenzeno (PS-DVB).

1.3.2 Nuevas fases para columnas capilares

A pesar del gran número de columnas capilares de GC disponibles en el mercado que se pueden emplear para IT-SPME, la variedad de sorbentes es todavía limitada, especialmente para aquellas columnas de menor diámetro, necesarias para LC miniaturizada, y el espesor de fase insuficiente para algunas determinaciones. Como consecuencia, en los últimos años ha aumentado significativamente el interés por desarrollar nuevos materiales que se puedan utilizar como sorbentes y mejorar la eficiencia y selectividad de la extracción. Seguidamente se detallan los materiales más utilizados para el desarrollo de nuevas fases para IT-SPME.

Nanomateriales

Hoy en día los nanomateriales se emplean en multitud de campos del conocimiento como la medicina, la electrónica, la agricultura, la industria alimentaria o la biotecnología. En el campo de la Química Analítica, este tipo de materiales se ha empleado ampliamente como sorbentes en diferentes técnicas de extracción (González-Funzalida, Jornet-Martínez, Herráez-Hernández & Campíns-Falcó, 2019; Moliner-Martínez, 2017; Ahmadi, Elmongy, Madrakian & Abdel-Rehim, 2017).

Desde el punto de vista de su utilización como sorbente para técnicas de tratamiento de muestra, los nanomateriales pueden incrementar la capacidad de extracción por dos efectos diferentes y complementarios. Por un lado, se ha observado que al añadirlas a la fase de extracción se modifica la morfología del sorbente incrementándose su porosidad (Manoudis, Tsakalof, Karapanagiotis & Zuburtikudis, 2009). Por otro lado, al inmovilizar los materiales en la fase de extracción se pueden establecer nuevas interacciones o incrementar el número e intensidad de las ya existentes además puede favorecer la vida útil del capilar, disminuyendo su fragilidad. Las principales ventajas del uso de nanomateriales como sorbentes en técnicas de tratamiento de muestra son el incremento de la capacidad de adsorción y preconcentración, su fácil funcionalización y la posibilidad de reutilización (Castillo-García, Aguilar-Caballos & Gómez-Hens, 2016).

Los nanomateriales se pueden clasificar atendiendo a su tamaño o a su composición. En este caso, se ha optado por clasificarlos según su composición ya que este parámetro es más interesante e influyente a la hora de explicar el comportamiento y las interacciones con los analitos, en definitiva, su viabilidad como fase de extracción. Según su composición, los nanomateriales se pueden clasificar en carbonáceos, siliconas, metálicos, óxidos metálicos y magnéticos.

Nanomateriales carbonáceos

Desde que se descubrió por primera vez el fullereno C_{60} en 1985, se han descrito multitud de nanoestructuras alotrópicas del carbono, como fullerenos, nanotubos de carbono (de pared simple o múltiple), grafeno, óxido de grafeno, nanodiscos de carbono, nanoconos de carbono, nanocuernos de carbono o nanodiamantes, convirtiéndose en uno de los tipos de materiales más prometedores como sorbentes para SPME.

En general se trata de estructuras formadas por anillos de átomos de carbono de diferente tamaño organizados de manera diferente en las tres dimensiones. La estructura más sencilla es la del grafeno, ya que se trata de una lámina bidimensional de átomos de carbono con hibridación sp^2 (Figura 6). El grafeno, es un material interesante para ser utilizado como sorbente en las técnicas de tratamiento de muestra, ya que posee una elevada área superficial (teóricamente $2630 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) (Azzouz et al., 2018). Además, se trata de un sistema con una elevada deslocalización electrónica de tipo π , lo que permite establecer fuertes interacciones de tipo π - π con aquellos analitos que contienen sistemas de electrones deslocalizados, como es el caso de los compuestos aromáticos (Tian et al., 2013). Cabe destacar que la interacción con los analitos puede establecerse por las dos caras de la lámina.

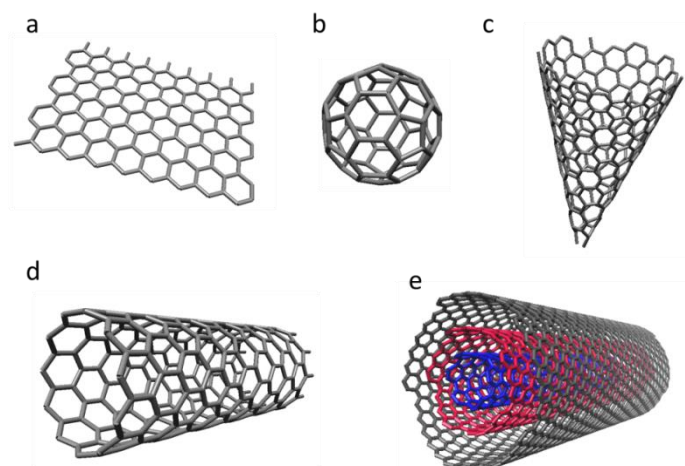


Figura 6. Estructuras alotrópicas del carbono más utilizadas como sorbente: a) grafeno; b) fullereno; c) nanocorno; d) nanotubo de pared simple; e) nanotubo de pared múltiple.

Además, el grafeno puede ser modificado fácilmente para aumentar su selectividad. Así, cuando las láminas de grafeno se someten a un proceso de oxidación se obtiene el óxido de grafeno. Este material tiene una disposición similar al grafeno, pero con átomos de oxígeno en su estructura (grupos carboxilo y ácido carboxílico) que permiten que, además de las interacciones propias del grafeno, el óxido de grafeno pueda interactuar con los analitos a través de interacciones tipo dador-aceptor de electrones y puentes de hidrógeno (Azzouz et al., 2018). Tanto el grafeno como el óxido de grafeno se han utilizado como fase de extracción en IT-SPME.

En 2013 Zhang et al., (2013) describieron un procedimiento para cubrir un capilar de PTFE con múltiples capas de grafeno. En este procedimiento, el capilar se recubría con una capa de dopamina y seguidamente se hacía pasar una dispersión de grafeno. Transcurrido un tiempo, el grafeno quedaba unido covalentemente a los grupos amino de la dopamina. Seguidamente, se hacía pasar de nuevo la dispersión de grafeno por el capilar tantas veces como capas de grafeno se deseaban. En este caso, los autores formaron tres capas de grafeno sobre el capilar. Una vez optimizada la síntesis, la fase de extracción desarrollada se empleó para la extracción de PAHs en muestras de agua medioambientales, obteniéndose buenas recuperaciones. En este caso la retención se debe principalmente a las interacciones de tipo π - π entre el grafeno y el sistema de electrones deslocalizado de las moléculas de PAHs.

Posteriormente, Wang y colaboradores (Wang, Zhou, Liao, Zhang & Chen, 2017) inmovilizaron óxido de grafeno en un capilar de polietereftercetona (PEEK), empleando dopamina como agente entrecruzante. Este capilar fue utilizado como fase de extracción para la determinación de alcaloides cuaternarios utilizando IT-SPME-LC-MS/MS. Al utilizar óxido de grafeno como sorbente, los alcaloides quedaban retenidos en la fase de extracción mediante interacciones hidrofóbicas, de tipo π - π y por interacciones de intercambio iónico entre la carga negativa de los grupos carboxilo del sorbente y la carga positiva del grupo amino de los analitos.

Por otro lado, Tan et al. (2015) propusieron la utilización de un capilar de sílice fundida recubierto con óxido de grafeno para la determinación de triazinas en aguas mediante IT-SPME-LC-MS/MS. En este caso, la inmovilización del grafeno en las paredes del capilar se llevó a cabo utilizando 3-(aminopropil)trimetoxi silano (APTES) como entrecruzante.

Otra de las formas alotrópicas del carbono más utilizada como sorbente son los nanotubos de carbono (CNTs). Estos nanomateriales consisten en láminas de grafeno enrolladas formando un cilindro. Existen de dos tipos de nanotubos, los de pared simple en los que únicamente hay una lámina plegada (SWCNTs), y los de pared múltiple que consisten en diferentes SWCNTs concéntricos unidos por fuerzas de Van der Waals (MWCNTs) (Figura 6). Dada su geometría única, poseen excelentes propiedades mecánicas lo que permite su utilización en multitud de campos como la biomedicina, la electrónica, la catálisis o la Química Analítica (Tian et al., 2013). Además, al igual que el grafeno, los CNTs son materiales interesantes para ser utilizados como sorbentes en IT-SPME, ya que también poseen una elevada capacidad de adsorción y pueden ser modificados químicamente a fin de incrementarla.

Por ejemplo, Argente-García et al. (2016) desarrollaron un procedimiento analítico para la determinación de anfetaminas en muestras biológicas mediante IT-SPME-CapLC. Como fase de extracción, emplearon una columna comercial TRB-35 en la que previamente inmovilizaron CNTs carboxilados (c-CNTs). La carboxilación de los CNTs se obtuvo tras someterlos a un proceso oxidante con ácido nítrico. En este caso, la modificación de los CNTs perseguía dos objetivos, por un lado, su inmovilización en la columna de sílice empleando APTES y glutaraldehído, y por otro, que los grupos carboxilos interaccionaran con el analito mejorando la capacidad de extracción de la columna. Al inmovilizar los c-CNTs en la fase de extracción la señal se incrementó hasta tres veces respecto a la fase sin modificar. Este incremento se debió a las interacciones de tipo π - π que podían establecerse entre los c-CNTs inmovilizados y los grupos aromáticos de los analitos, así como a las interacciones de tipo puente de hidrogeno entre los grupos carboxilo de los c-CNTs y los grupos amino de las anfetaminas.

Estos nanomateriales también pueden ser inmovilizados en monolitos orgánicos, anclándolos covalentemente al material polimérico o sintetizando el polímero en presencia del nanomaterial, de manera que éste quede embebido en la red polimérica. Esta segunda opción fue la seleccionada por Ling y colaboradores (Ling, Zou & Chen 2017) que sintetizaron un monolito de poli(butilmetacrilato-co-etilendimetacrilato) en presencia de MWCNTs modificados con β -ciclodextrina, de manera que este material quedaba retenido dentro de la red polimérica, incrementándose su capacidad de extracción. El material desarrollado se aplicó satisfactoriamente como sorbente para la determinación de psolareno e isopsolareno en frutas y plasma de ratón mediante IT-SPME-LC.

Para el desarrollo de un monolito de dimetacrilato de etilenglicol modificado con grafeno Chen et al. (2019) ha propuesto recientemente un procedimiento que consiste en anclar covalentemente el nanomaterial a la superficie del polímero. Para ello, se mezcla en un capilar de sílice previamente acondicionado con una dispersión del monómero, el porogen, el iniciador radicalario y el óxido de grafeno, de manera que cuando tiene lugar la reacción de polimerización el óxido de grafeno se enlaza covalentemente a la red polimérica por los grupos carboxilo. La columna monolítica obtenida se ha empleado satisfactoriamente como fase de extracción para IT-SPME acoplada a LC-MS/MS para la determinación de sulfonamidas en muestras de leche y carne de pollo.

En esta tesis se han inmovilizado c-SWCNTs y c-MWCNTs en columnas capilares comerciales de TRB-5 y TRB-35 para la extracción y preconcentración de PAHs y triazinas y sus productos de degradación mediante IT-SPME.

Nanopartículas metálicas y óxidos metálicos

Las nanopartículas metálicas y de óxidos metálicos son nanomateriales formados por uno, dos o tres metales y/u óxidos metálicos. Se trata de materiales muy interesantes desde el punto de vista de su utilización como sorbentes puesto que tienen una gran área superficial y elevada eficiencia de absorción (Azzouz et al., 2018). En los óxidos metálicos los sitios activos contienen grupos hidroxilo. Estos grupos pueden establecer interacciones de tipo intercambio iónico, actuando como catión o anión según el pH. Además, tanto las NPs de óxidos metálicos como las NPs metálicas pueden actuar como ácidos de Lewis, presentando una fuerte interacción con especies que puedan actuar como bases de Lewis (Xu, Wu, Ye, Yuan & Feng, 2016). Las NPs metálicas y de óxidos metálicos más utilizadas son las de Au, Ag, Al₂O₃, Fe₃O₄, CeO₂, SiO₂, TiO₂, ZnO y ZrO₂. A pesar de la amplia utilización de estos materiales como sorbente en técnicas de microextracción en fibra y otros formatos de extracción, su empleo en IT-SPME todavía no es habitual.

Feng, Tian, Wang, Luo & Sun (2018) utilizaron como fase de extracción una columna capilar rellena con fibras de basalto modificadas con NPs de Au en la determinación de PAHs en muestras de agua mediante fibra-IT-SPME-LC-DAD.

El TiO₂ se ha empleado como fase de extracción en diferentes técnicas de extracción en fase sólida (SPE) y SPME para el enriquecimiento de fosfopéptidos, ya que se establecen interacciones mono- y bidentadas entre los átomos de oxígeno del grupo fosfato del fosfopéptido, el cual presenta una carga parcial negativa, y los átomos de titanio con una carga parcial positiva. Dado que esta interacción también ocurre cuando el TiO₂ se encuentra en forma de NPs, y a causa de la elevada área superficial de este tipo de materiales, en los últimos años se ha incrementado el número de tratamientos de muestra propuestos que utilizan NPs de TiO₂ como sorbente para la extracción de fosfopéptidos. Sin embargo, su utilización como sorbente en IT-SPME aún es escasa.

En 2008 Lin y colaboradores (Li, Xu, Wu & Feng, 2009) propusieron la utilización de un capilar de sílice recubierto con NPs de TiO_2 para la extracción de fosfopéptidos. La síntesis de la fase de extracción se llevó a cabo mediante un proceso de deposición líquida. Para ello, una vez el capilar de sílice había sido activado con NaOH y tratado térmicamente, el capilar se rellenó con una disolución de $(\text{NH}_4)_2\text{TiF}_6$ y H_3BO_3 y se dejó reaccionar durante 16 horas a $40\text{ }^\circ\text{C}$ para la deposición. Seguidamente, se eliminó el exceso de reactivos y se sometió a un tratamiento de $300\text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 horas para incrementar la porosidad del film formado (Lin et al., 2008). Un procedimiento similar se empleó para la obtención de un capilar recubierto con NPs de SiO_2 que presentaba un marcado carácter hidrofóbico, y que fue aplicado satisfactoriamente para la extracción de PAHs y disruptores endocrinos mediante IT-SPME-UV.

Un ejemplo más reciente de la utilización de este tipo de NPs como fase de extracción para IT-SPME es el procedimiento descrito por Li y colaboradores para la determinación de fosfopéptidos mediante IT-SPME-LC-MALDI-TOF-MS, (Li et al., 2019). En este trabajo se propone la utilización de columnas capilares rellenas de nanopartículas de TiO_2 mesoporosas como fase de extracción. Para preparar las columnas de extracción, en primer lugar fue necesario sintetizar un pequeño segmento de monolito (1.5 mm) en uno de los extremos de la columna capilar, a fin de que actuara como frita impidiendo que las NPs de TiO_2 escaparan. Una vez sintetizada la frita, se rellenó el capilar con las NPs de TiO_2 empleando una corriente de nitrógeno. Finalmente, se sintetizó el monolito (frita) en el otro extremo de la columna capilar. Según los autores, la fase de extracción desarrollada presenta una excelente sensibilidad y selectividad para el enriquecimiento de péptidos fosforilados en muestras complejas.

Las NPs de Fe_3O_4 se han utilizado ampliamente como sorbente para SPME puesto que además de poseer las propiedades ya descritas, se trata de un material superparamagnético que se puede utilizar en IT-SPME magnética. Este tipo de IT-SPME consiste en aplicar un campo magnético a la fase de extracción de manera que se crea un orden magnético generando regiones con diferente gradiente magnético. Al procesar la muestra por el capilar de extracción sometido a un campo magnético determinado, los analitos diamagnéticos tienden a retenerse fuertemente en las regiones donde el campo magnético es mínimo, mejorándose la capacidad de extracción. Finalmente, para la elución se elimina el campo magnético externo, con lo que los analitos ya no están tan fuertemente retenidos y pueden ser eluidos fácilmente con el disolvente adecuado o la fase móvil (Moliner-Martínez, Prima-García, Ribera, Coronado & Campíns-Falcó, 2012).

A causa de la poca estabilidad de las NPs de Fe_3O_4 y de su baja capacidad de adsorción, éstas suelen utilizarse recubiertas de otros compuestos. De esta manera el núcleo interno del sorbente es Fe_3O_4 confiriéndole propiedades supermagnéticas, y la parte externa es un material que actúa como sorbente y estabilizador de las NPs. Al sumarse ambos fenómenos de retención, se mejora significativamente la capacidad de extracción del material. Los materiales más comúnmente empleados para cubrir las NPs de óxido de hierro son sílice, alúmina, grafeno, polímeros y surfactantes (Hashemi, Zohrabi & Shamsipur, 2018). Por ejemplo, González-Fuenzalida y colaboradores proponen cubrir las nanopartículas metálicas con sílice y posteriormente inmovilizarlas en un capilar de sílice fundida. Este capilar se utilizó como fase de extracción para la determinación de triazinas en muestras de agua por IT-SPME-magnética-CapLC-DAD (González-Fuenzalida et al., 2014).

Las NPs de Fe_3O_4 también pueden ser inmovilizadas en un polímero monolítico. Por ejemplo, Mei y colaboradores han inmovilizado este tipo de nanopartículas en un monolito orgánico para conferirle a la fase de extracción propiedades supramagnéticas. Antes de inmovilizar las NPs, éstas fueron recubiertas con un polímero de silicio al que posteriormente se ancló la molécula de 3-(metacriloxi)propiltrimetoxisilano (γ -MAPS). Esta molécula polimeriza con los monómeros que forman el monolito, de manera que se unen covalentemente las NPs al polímero. En este caso, se ha sintetizado el polímero poli(octilmetacrilato-co-etilenglicoldimetacrilato)- Fe_3O_4 @ SiO_2 @ γ -MAPS. Este material, se ha utilizado para la extracción y cuantificación de triazinas empleando IT-SPME magnética acoplada a LC-DAD en muestras ambientales de agua (Mei et al., 2016).

En esta tesis, se ha estudiado la influencia en la capacidad de extracción de un material polimérico de tetraetilortosilicato (TEOS) y trimetoxietilsilano (MTEOS) dopado con NPs de Au, Ag, SiO_2 , TiO_2 , ZrO_2 , CuO, ZnO, Al_2O_3 y Fe_3O_4 . Estas fases se han utilizado para la determinación de diversas sulfonilureas y triazinas.

Líquidos iónicos (ILs)

Los líquidos iónicos (ILs) son otra de las opciones utilizadas en los últimos años para incrementar la capacidad de extracción en las técnicas de SPME, incluida la IT-SPME. Los ILs son sales iónicas que se encuentran en estado líquido a temperatura ambiente. Generalmente, están formados por un catión orgánico (imidazolio, piridinio o un amonio cuaternario) y un anión inorgánico u orgánico (Cl^- , Br^- , PF_6^- , trifluorometilsulfonato...) (Mei, Huang & Chen, 2019). Este tipo de compuestos son interesantes como sorbentes puesto que pueden retener a los analitos a través de diferentes mecanismos de interacción tales como interacciones de tipo hidrofóbico e hidrofílico, de intercambio iónico, de tipo π - π o por puentes de hidrógeno (Masini et al., 2017).

Inicialmente los ILs se unían covalentemente a la fase de extracción (Han, Wang & Liu, 2012). Sin embargo, en la actualidad se utilizan como un eslabón más de la cadena polimérica, es decir se añade el IL a la mezcla de monómeros y éste actúa como un monómero más, siendo parte de la red polimérica que forma la fase de extracción. El polímero obtenido presenta una elevada resistencia térmica y mecánica, durabilidad y mayor reutilización que los ILs por separado, características muy similares a los polímeros ordinarios (Mei et al., 2019).

Como ejemplos de la utilización de ILs como sorbentes para IT-SPME cabe citar el material propuesto por Feng, Wang, Tian, Luo & Sun, 2017 basado en el polímero monolítico 1-dodecil-3-vinilimidazolium el cual se utilizaba para recubrir fibras de acero que posteriormente se empaquetaban en un capilar PEEK, este material se utilizó como fase para IT-SPME-LC-DAD en la determinación de PAHs en agua. Además, los autores compararon la sensibilidad del procedimiento propuesto con otros procedimientos descritos en la literatura, concluyendo que el método propuesto posee 200 veces mayor capacidad de extracción que otras técnicas de SPME. Los límites de detección (LODs) obtenidos para los PAHs empleando la fase de extracción propuesta fueron inferiores a los descritos para IT-SPME empleando fases comerciales. En otro estudio más reciente, se ha propuesto un procedimiento para la determinación de ftalatos en agua empleando IT-SPME-LC-DAD con el mismo material polimérico, pero esta vez recubriendo fibras de basalto. Como en el caso anterior, se obtuvieron elevados factores de extracción y bajos LODs (Feng, Wang, Tian, Luo & Sun, 2018).

Polímeros de impronta molecular (MIPs)

Una posibilidad para mejorar la selectividad de las columnas capilares, consiste en utilizar como fase de extracción un polímero de impronta molecular (MIPs, *Molecular Imprinted Polymers* en inglés). Los MIPs son polímeros tridimensionales con huecos específicos inducidos por una molécula molde, lo que permite una interacción selectiva con aquellos compuestos cuya estructura es similar a dicha molécula.

El procedimiento para sintetizar este tipo de polímeros es parecido al descrito para la síntesis de monolitos, únicamente hay que tener en cuenta que hay que añadir a la mezcla de monómeros la molécula molde, la cual tiene que tener una estructura similar a los analitos y no polimerizar con los monómeros. Cuando se produce la polimerización, las cadenas poliméricas crecen alrededor de la molécula molde en las tres dimensiones. Seguidamente se elimina la molécula molde obteniendo un polímero con huecos cuyo tamaño, forma e interacción química es específica para moléculas con una estructura similar a la estructura de la molécula empleada como molde (Lashgari & Yamini, 2019).

Entre las diferentes propiedades de los MIPs (elevada resistencia térmica, mecánica y química, fácil síntesis y bajo coste) su selectividad es una de las más interesantes desde el punto de vista de su utilización como sorbente, puesto que se obtiene una fase de extracción creada para retener y extraer exclusivamente aquellos compuestos que tienen una estructura determinada. Además de la selectividad, los sitios específicos de estos materiales pueden mejorar la eficiencia de la extracción (Ansari & Karimi, 2017).

En 2001 Mullett y colaboradores (Mullett, Martin & Pawliszyn, 2001) describieron por primera vez la utilización de un MIP como sorbente para IT-SPME empleando un capilar de extracción relleno con partículas de MIP. El material se aplicó satisfactoriamente a la determinación de propanolol en muestras biológicas.

Otra opción para preparar fases de extracción basadas en MIPs consiste en sintetizar directamente el MIP dentro del capilar. Esta fue la alternativa utilizada por Zarejousheghani, Möder & Borsdorf (2013) a fin de desarrollar un procedimiento IT-SPME fuera de línea para extraer y preconcentrar 4-nitrofenol en muestras de aguas medioambiental. Para la síntesis del MIP emplearon 4-nitrofenol como molécula molde, ácido metacrílico y dimetacrilato de etilenglicol como monómero funcional y entrecruzante, respectivamente, y acetonitrilo como formador de poros.

Más recientemente, Lhotská et al., (2019) han sintetizado un MIP como fase de extracción en IT-SPME-LC con un detector de fluorescencia (FD) para la determinación de citrina en cereales y suplementos alimenticios. Después de comparar la capacidad de extracción de diferentes MIPs sintetizados concluyeron que los mejores resultados se obtenían empleando ácido 1-hidroxi-2-naftálico como molécula molde, acrilamida como monómero funcional, dimetacrilato de etilenglicol como entrecruzante y acetonitrilo como generador de poros. La sensibilidad y la selectividad obtenida con la fase de extracción propuesta fue superior a la obtenida empleando sorbentes tradicionales como una fase C18 (Lhotská et al., 2019).

Compuestos metal-orgánico estructurados (MOFs)

Los compuestos MOFs son polímeros cristalinos de coordinación bidimensional o tridimensional formados por el ensamblaje de clústers metálicos o iones metálicos coordinados con ligandos orgánicos lo que da lugar a una estructura porosa (Pang, Liao, Huang, Ye & Yuan, 2019)).

Este tipo de materiales poseen una gran área superficial ($1000-10400 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) son fáciles de sintetizar y modificar, y tienen una elevada resistencia química y térmica. Además, al tener una estructura polimérica cristalina, las moléculas que lo constituyen están ordenadas y el tamaño de los poros y cavidades es constante a lo largo de la misma. Todas estas propiedades han hecho posible que los MOFs se utilicen en multitud de aplicaciones como la adsorción y almacenamiento de CO_2 , hidrógeno o vapor de agua, o en catálisis, separación, magnetismo... (Lashgari et al., 2019).

Entre los diferentes usos de los MOFs cabe destacar su empleo como sorbentes en técnicas de SPME, ya que estos materiales mejoran la estabilidad y selectividad de la fase extractante a causa de la uniformidad en el tamaño y superficie de poro. Además, al estar su estructura formada por canales separados por nanospacios facilita la interacción entre el analito y los sitios activos. También poseen una estructura química fácilmente modificable lo que permite incrementar la selectividad y sensibilidad (Lashgari et al., 2019).

Diferentes MOFs se han utilizado como sorbentes en IT-SPME. Así, Luo, Li & Hu (2017) han incorporado el MOF $\text{NH}_2\text{-MIL-53(Al)}$ en un monolito de poli(estireno-co-divinilbenceno-co-ácido metacrílico) para la extracción y determinación de estrógenos en orina mediante IT-SPME-LC-FD. En este caso la fase de extracción se sintetizó en un único paso añadiendo el MOF a la mezcla de monómeros.

Otra opción es la propuesta por Pang et al., (2019) que utilizan una síntesis en dos etapas. En primer lugar se sintetiza el polímero monolítico dentro del capilar de forma similar a como se ha descrito en el apartado anterior. A continuación, el MOF se ancla covalentemente al polímero sintetizado. En este caso el MOF ZIF-8 se ancló covalentemente al polímero poli(VA-co-ED) sintetizado dentro de un capilar de sílice fundida. La fase de extracción obtenida se utilizó satisfactoriamente para la determinación de fluoroquinonas en agua y alimentos mediante IT-SPME acoplada a LC-FD.

Inmunosorbentes

Los inmunosorbentes son compuestos biológicos que se basan en la interacción de reconocimiento molecular anticuerpo-antígeno. La elevada especificidad de este tipo de interacciones ha dado lugar a su utilización como sorbentes para técnicas de SPE y SPME aplicadas fundamentalmente al análisis de muestras ambientales y biológicas (Masini et al., 2017; Pichon, Combès & Delaunay, 2019).

Un ejemplo de estas aplicaciones es la propuesta de Brothier & Pichon, (2013) para la extracción y determinación de microcistinas-LR en muestras de agua y extractos intracelulares mediante IT-SPME-NanoLC-UV. Como fase de extracción emplearon un capilar de sílice relleno de un monolito de TEOS y APTES modificado con anticuerpos monoclonales anti-micocistina-LR. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto la gran utilidad de estas fases de extracción, tanto por su elevada sensibilidad, selectividad y reproducibilidad, como por la facilidad con la que se sintetizan. Esta última faceta convierte al monolito en una herramienta prometedora para la síntesis de nuevas fases de extracción inmovilizando otras moléculas biológicas como aptámeros o receptores moleculares.

En el campo del análisis ambiental, los inmunosorbentes han sido utilizados como fase de extracción en IT-SPME para la determinación de bisfenol A en muestras de agua (Li, Wang, Zhou & Zhao, 2008), así como para la determinación de diferentes insecticidas como deltametrina, flumetrina, flucitrinato y permetrina (Liang et al., 2010).

Materiales de acceso restringido (RAMs)

El análisis de muestras biológicas no es una tarea fácil debido principalmente a la presencia de macromoléculas. Estos compuestos son incompatibles con la mayoría de técnicas analíticas como la LC, ya que obstruyen las conducciones y/o empeoran la separación cromatográfica. Además, estos compuestos pueden ser absorbidos por la fase de extracción utilizada, disminuyendo su capacidad de retención, y por tanto empeorando la sensibilidad y la selectividad (Faria, 2017).

La precipitación de las proteínas es una manera fácil y rápida de eliminar esta interferencia. Sin embargo, este procedimiento puede suponer una pérdida de la sensibilidad a causa de la co-precipitación de algunos analitos o la supresión iónica en espectrometría de masas por la presencia de agentes precipitantes (Majors, 1991). Por ello, es necesario buscar nuevas estrategias que permitan eliminar las proteínas de las muestras sin interferir en la posterior determinación o causar una pérdida de los analitos. En este sentido se propuso el uso de técnicas de extracción basadas en materiales de acceso restringido (RAMs).

Los RAMs son materiales sorbentes capaces de retener diferentes tipos de analitos independientemente de la presencia de proteínas en la muestra. Su elevada selectividad se basa en un proceso de exclusión molecular. Para la síntesis de estos materiales se modifica la superficie del sorbente con compuestos hidrofílicos que impiden que las especies de mayor peso molecular como las proteínas interactúen con el sorbente. Es decir, se crea una capa sobre el sorbente que actúa como filtro, y únicamente las moléculas de menor tamaño pueden ser retenidas en el sorbente (Huang et al., 2018).

Una ventaja adicional es que estos materiales pueden combinarse fácilmente a fin de producir sorbentes mejorados. Por ejemplo, Souza et al., 2016 han sintetizado un MIP en un capilar de sílice fundida, empleando 4-vinilpiridina, dimetacrilato de etilenglicol y bencilparabeno como molécula molde. Una vez sintetizado el polímero, se pasa por el capilar una disolución de dimetacrilato de glicerol con peroxodisulfato de potasio y se deja reaccionar a 70 °C durante 20 h. Con esta segunda etapa se consigue anclar el grupo hidrofílico a la superficie del monolito, obteniendo una fase de extracción basada en un MIP-RAM. Esta fase de extracción se aplicó satisfactoriamente a la determinación de parabenos en muestras de leche materna mediante IT-SPME-UHPLC-MS/MS sin necesidad de realizar ningún tratamiento previo de la muestra.

Más recientemente, en la misma línea se ha propuesto la síntesis de un RAM basado en un monolito inorgánico de metiltrimetoxisilano y APTES. Una vez sintetizado el monolito dentro del capilar, éste se ha modificado anclando sobre su superficie la molécula γ -gluconolactona. La fase de extracción obtenida se ha empleado para la extracción y preconcentración de residuos de antibióticos en muestras de leche (Huang et al., 2018).

Monolitos

Una de las características más importante de los materiales monolíticos es su estructura, ya que presentan macroporos y mesoporos. Los macroporos aseguran un transporte dinámico rápido lo que permite incrementar el flujo de la fase móvil, disminuyéndose el tiempo de análisis y sin producir un incremento significativo de la presión respecto al uso de columnas particuladas. Además, la transferencia de masa por convección está favorecida, lo que es preferible en los procesos de extracción (Queiroz & Melo, 2014).

Dependiendo de la naturaleza de los monómeros, los monolitos se pueden clasificar en monolitos orgánicos, monolitos basados en silicio y monolitos híbridos. A su vez, los monolitos pueden ser modificados inmovilizando sobre su superficie una molécula u otro material o nanomaterial. La modificación de su superficie puede realizarse en otra etapa diferente a la síntesis, o in-situ si se añade el material a inmovilizar a la mezcla de monómeros.

La síntesis del material monolítico orgánico es un procedimiento sencillo basado en una reacción de polimerización que normalmente se produce in-situ y únicamente requiere de una mezcla de monómeros (monómero funcional y entrecruzante), un iniciador radicalario (el más utilizado es el azobisisobutironitrilo, AIBN) y una mezcla de disolventes denominada porogen, cuya función es formar los poros. Seguidamente, la mezcla homogeneizada se introduce dentro de una columna capilar, que previamente ha sido tratada, y se inicia la reacción de polimerización. Dicha reacción se puede iniciar fotoquímica o térmicamente, siendo esta última opción la más utilizada.

En la literatura se pueden encontrar gran cantidad de trabajos que proponen la utilización de monolitos orgánicos de diferente naturaleza como fase de extracción para IT-SPME. En el campo del análisis ambiental, Wu y colaboradores (Wu, Xu, Jiang, Wang & Ding, 2018) proponen la utilización de un monolito de poli(octadecil metacrilato-co-etilen dimetacrilato) para la determinación de ácidos grasos trans en muestras de café instantáneo. El material sorbente desarrollado posee un marcado carácter hidrofóbico, siendo adecuado para la extracción de analitos apolares como los ácidos grasos. Los mismos autores han descrito la utilización de un monolito de poli(ácido metacrílico-co-dietilbenceno) para la determinación de micotoxinas en muestras de cereales.

Para el análisis de tiazoles en muestras de agua ambientales se ha empleado un monolito de poli(4-vinilpiridina-co-etilendimetacrilato) (Pang, Mei, Yuan & Huang, 2018). En la misma línea se han determinado PAHs en muestras de agua y leche empleando como fase de extracción un monolito de poli(9-vinylantraceno-co-dimetacrilato de etilenglicol) (Pang, Yuan & Huang, 2018).

Los monolitos orgánicos también se han empleado como fase de extracción en IT-SPME para el análisis clínico. Así, se ha utilizado un monolito de poli(butilmetacrilato-co-dimetacrilato de etilenglicol) para la extracción de diferentes medicamentos antipsicóticos y sus metabolitos en muestras de sangre (Beloti, Miranda & Queiroz, 2019). También se han determinado alcaloides procedentes del tabaco en muestras de orina mediante IT-SPME acoplada a LC-MS empleando para la extracción una columna rellena con poli(N-isopropilacilamida-co-divinilbenceno-co-N,N'-metilendiácilamida) (Wu, Yang, Wang, Wei & Ding, 2019).

Los monolitos inorgánicos están basados mayoritariamente en el empleo de silicio, y se sintetizan mediante una reacción sol-gel que tiene lugar en dos etapas. En la primera etapa se produce la hidrólisis de los alcoxisilanos (monómeros); para que esta reacción tenga lugar es necesario añadir un catalizador, normalmente HCl o NH₄OH. En la segunda etapa se produce la policondensación de los alcóxidos, es decir, se unen los monómeros a través de enlaces Si-O-Si formando cadenas poliméricas entrelazadas, y por tanto el monolito. Para generar los mesoporos y macroporos se puede emplear PEG o urea. La estructura de los alcoxisilanos definirá la naturaleza del monolito, especialmente los grupos funcionales presentes en la superficie, y por tanto, el tipo de interacciones que puede establecer con los analitos, es decir, la afinidad de la fase extractiva por los analitos.

La síntesis de este tipo de monolitos es mucho más delicada y complicada en comparación con los monolitos orgánicos debido a la contracción del material polimérico, lo que puede provocar la rotura de material sintetizado (Masini et al., 2017). Una solución a este problema consiste en sintetizar el monolito dentro de un capilar de sílice y anclarlo covalentemente a sus paredes. La estructura y tamaño de poro también es diferente respecto a los polímeros orgánicos; ambos tienen macroporos de entre 1-2 μm que permiten trabajar a flujos más elevados sin un aumento de la presión. Sin embargo, los polímeros inorgánicos de silicio presentan mesoporos con un tamaño de aproximadamente 13 nm que le confieren altas áreas superficiales. Esto permite que se establezcan un mayor número de interacciones entre el monolito y los analitos (Masini et al., 2017). Además, el número de alcóxidos (monómeros) es mucho más reducido que el número de monómeros orgánicos, lo que limita la variedad de monolitos que se pueden sintetizar.

A causa de la dificultad y de la baja precisión de la síntesis, los monolitos inorgánicos no han sido ampliamente utilizados como fase de extracción en IT-SPME. Sin embargo, sí se han utilizado como fase estacionaria debido su gran eficiencia de separación (Zajickova, 2016).

Los monolitos híbridos orgánicos-inorgánicos están formados por monómeros orgánicos e inorgánicos que polimerizan entre sí. Se trata de una alternativa interesante puesto que combina las propiedades de los polímeros inorgánicos como la elevada área superficial, la presencia de mesoporos y la elevada estabilidad mecánica con la resistencia química (amplio rango de pH de trabajo) o la facilidad de preparación propia de los polímeros orgánicos (Masini et al., 2017).

El uso de este tipo de materiales se ha extendido desde que en el año 2000 Hayes y Malik (Hayes & Malik, 2000) propusieran por primera vez su síntesis. Hoy en día se pueden encontrar diversos ejemplos de la utilización de monolitos híbridos como fase de extracción para IT-SPME (Lv et al., 2016; Zajickova, 2016; Miranda, Gonçalves & Queiroz, 2019)

En todos los casos, la estructura y presencia de determinados grupos funcionales en los monómeros define las interacciones que tienen lugar entre el analito y la fase de extracción, y por tanto la capacidad de extracción de ésta. Es decir, la selectividad y en menor medida la sensibilidad de la extracción va a depender de la estructura de los monómeros y los analitos. Por tanto es interesante diseñar fases de extracción con una buena afinidad por los analitos.

En esta línea se han sintetizado fases de extracción que aprovechan la afinidad entre el ácido bórico y los compuestos con grupos cis-diol para la extracción selectiva de carbohidratos, ácido ribonucleico, nucleótidos, glicopéptidos o glicoproteínas (Masini et al., 2017). Para la obtención de la fase monolítica con grupos borato en su superficie se puede emplear como monómero funcional el ácido 4-vinilfenilborónico (VPBA) o el ácido 3-acrilamidofenilborónico. Por ejemplo, Janků, Komendová & Urban, 2016 aprovecharon esta particular afinidad para la extracción y preconcentración de dopamina en muestras de orina.

Aparte de la afinidad por los grupos cis-diol, el grupo borato puede actuar como base de Lewis, interaccionando con aquellos analitos que contienen algún grupo funcional que actúe como donador de electrones, como el grupo amino (Hu, Zhang, Zhang, Huang & Yuan, 2014). Además, también puede interaccionar a través de interacciones de tipo hidrofóbicas, π - π y puentes de hidrógeno (Espina-Benítez, Randon, Demesmay & Dugas, 2017). Por ello, se han utilizado monolitos con grupos borato para la extracción y preconcentración de contaminantes con átomos de nitrógeno en su estructura (Hu et al., 2014) o herbicidas tipo sulfonilureas (Huang, Zhu & Pei, 2018).

Este último tipo de monolitos también ha sido estudiado en esta tesis. Concretamente se ha sintetizado un monolito con grupos borato dentro de un capilar de sílice fundida. Éste se ha utilizado como fase de extracción en IT-SPME acoplada a NanoLC para la determinación de diversas sulfonilureas.

1.4 MICROEXTRACCIÓN EN JERINGA (MEPS)

La microextracción en jeringa (MEPS, en inglés *Microextraction in Packed Syringe*) es otra técnica de tratamiento de muestra que, al igual que la IT-SPME, permite la extracción y preconcentración de los analitos, y puede ser acoplada tanto a GC como a LC.

La MEPS, propuesta en 2004 por Abdel-Rehim (Abdel-Rehim, 2004), es una miniaturización de la SPE en la que la cantidad de sorbente se reduce a unos pocos mg que se sitúan directamente dentro de una jeringa, cuyo volumen dependerá del volumen de muestra a procesar (Figura 7). La metodología de la extracción es similar a la SPE en cartucho. En primer lugar se acondiciona la fase de extracción; a continuación se hace fluir un determinado volumen de muestra de forma que los analitos quedan retenidos en el sorbente. Seguidamente, si se requiere, se eliminan interferentes mediante lavado. Finalmente se eluyen los compuestos de interés empleando un volumen reducido de disolvente orgánico o disolución tampón.

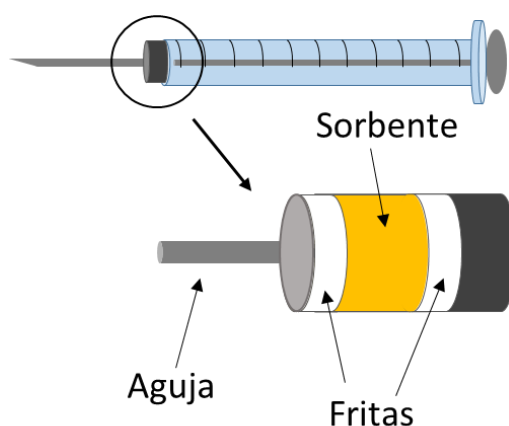


Figura 7. Diagrama de una jeringa para MEPS.

La MEPS puede acoplarse a LC, GC o directamente a un detector de masas. En el caso de la GC simplemente hay que sustituir la jeringa del inyector automático por otra que contenga el material sorbente, y programar el inyector para que realice las diferentes etapas del procedimiento de extracción (acondicionamiento, muestra, lavado y elución) (Moein, Abdel-Rehim & Abdel-Rehim, 2017).

Para esta técnica de tratamiento de muestra el material sorbente también es un parámetro a tener en cuenta para que la extracción sea selectiva y eficiente. Como sorbentes se han empleado materiales clásicos como partículas de sílice recubiertas con fases C2, C8 y C18, o partículas poliméricas de poliestireno (Moein, et al., 2017). Grueiro-Noche y colaboradores propusieron la utilización de partículas de fase C18 como sorbente para la extracción y preconcentración de medicamentos antiinflamatorios en muestras de agua empleando GC-MS. En este caso la extracción se realizó en línea sustituyendo la jeringa del inyector automático por otra con el material sorbente. (Grueiro-Noche, Fernández-Laespada, Pérez-Pavón, Moreno-Cordero & Muniategui-Lorenzo, 2011).

En la literatura se ha propuesto la utilización de otros materiales sorbentes para incrementar la capacidad de extracción y la selectividad. Así Soleimani, Bahrami, Afkhami & Shahna, 2018 propusieron la utilización de partículas de un MIP formado por ácido metacrílico y dimetacrilato de etilenglicol y ácido mandélico como molécula molde para la determinación de ácido mandélico y dos de sus metabolitos en muestras de orina, empleando LC-UV para la separación y detección.

Otra opción es la propuesta por Mashile, Mpupa & Nomngongo (2018), que consiste en la utilización como sorbente de partículas de carbón activo modificado con citosán. Dicho sorbente se aplicó a la determinación de parabenos en muestras de agua residual procedentes de una planta de tratamiento de agua.

Mousavi et al. (2019) han utilizado como sorbente partículas de un polímero que contiene un IL de imidazol para la extracción y preconcentración en línea de herbicidas tipo fenoxi en muestras de agua, y su posterior determinación por GC con detector de ionización de llama (GC-FID). El material también se aplicó satisfactoriamente a la determinación de PAHs y clorofenoles.

En esta tesis se propone la utilización de cenizas de café como sorbente para la extracción fuera de línea mediante MEPS de compuestos de amonio cuaternario (QACs) para el control de la dosificación de detergentes.

1.5 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA EN MODO HILIC

La LC es una de las técnicas más utilizadas para el análisis de todo tipo de compuestos en una amplia variedad de campos. La separación cromatográfica puede tener lugar bajo diferentes modos de trabajo. La separación en fase reversa es la más común, y se basa en la distribución de los analitos entre una fase estacionaria apolar y una fase móvil polar. Por tanto, se produce un aumento de la retención de los analitos cuando la polaridad de la fase móvil se incrementa, y/o cuando disminuye la polaridad de los analitos y de la fase estacionaria. La elución de los analitos principalmente tiene lugar en orden decreciente de polaridad, es decir, primero se eluyen los más polares, siendo la baja retención de este tipo de compuestos la principal limitación de la elución cromatográfica en fase reversa.

En el lado opuesto se sitúa la elución en fase normal. En este caso se trabaja con una fase estacionaria polar y una fase móvil apolar, que suele ser una mezcla de disolventes orgánicos apolares (como hexano o cloroformo) en la que hay que controlar adecuadamente el porcentaje de agua. Bajo este modo de separación, la elución tiene lugar en orden creciente de polaridad, siendo los analitos más polares los que más interaccionan con la fase estacionaria, y por tanto más se retienen. Los principales inconvenientes de este modo de separación cromatográfica son la baja solubilidad de los compuestos polares en los disolventes apolares que se utilizan como fase móvil, y los riesgos ambientales y para la salud del analista que supone el empleo de este tipo de disolventes como fase móvil.

En 1990 Alpert propuso como alternativa a la cromatografía en fase normal la llamada cromatografía de líquidos de interacción hidrofílica (hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC), para la separación y determinación cuantitativa de analitos hidrofílicos (Alpert, 1990). Esta técnica se basa en el empleo de una fase estacionaria polar y una mezcla de disolventes orgánicos próticos y apróticos con un bajo porcentaje de agua como fase móvil. El carácter hidro-orgánico de la fase móvil es una ventaja para el acoplamiento con espectrometría de masas, especialmente en aquellos detectores que utilizan ionización por electrospray, ya que mejora la eficiencia de la ionización (Nguyen & Schug, 2008). Además, la composición de la fase móvil es adecuada para disolver los compuestos más hidrofílicos resolviendo así uno de los principales inconvenientes de la elución en fase normal. En consecuencia, la cromatografía basada en HILIC permite la retención y separación de los compuestos más polares y/o compuestos iónicos.

Desde su introducción este tipo de cromatografía ha ido ganando adeptos, convirtiéndose en una herramienta muy útil para la determinación de un amplio número de compuestos polares como neurotransmisores, toxinas, aminoácidos, péptidos, proteínas, carbohidratos, nucleótidos, medicamentos o contaminantes ambientales (Taraji et al., 2018; Marrubini, Appelblad, Maietta & Papetti, 2018; Salas, Borrull, Fontanals & Marce, 2017; Zhang, Yang, Ge, Hu & Xia, 2017).

A pesar de la gran cantidad de procedimientos que emplean HILIC, aún existen discrepancias sobre el mecanismo de retención, y por tanto de separación. La teoría más aceptada explica el mecanismo de retención considerando las particiones hidrofílicas de la fase móvil. Los partidarios de esta teoría defienden que la superficie polar de la fase estacionaria atrae a las moléculas de agua presentes en la fase móvil, creándose una capa rica en agua alrededor, de manera que el porcentaje de agua es mayor en la zona próxima a la fase estacionaria que en la zona más alejada. Los analitos se distribuyen según su polaridad en la fase móvil, quedando los más polares más cerca de la fase estacionaria, y por tanto reteniéndose más (Kartsova, Bessonova & Somova, 2019). En la Figura 8, se muestra un esquema del mecanismo de retención de un analito hidrofílico según esta teoría. Obviamente, el mecanismo de retención es mucho más complejo ya que la retención no se debe únicamente a este fenómeno, sino que también hay que considerar las interacciones tipo hidrofóbicas, π - π , puentes de hidrógeno e intercambio iónico que pueden establecerse entre los analitos y la fase estacionaria (Jandera & Janás, 2017). La superposición de todos estos efectos, los cuales se pueden potenciar o minimizar seleccionando la fase estacionaria y la composición de la fase móvil, dan lugar a un método de separación que permite incrementar la selectividad y la resolución de la separación cromatográfica para compuestos polares y/o iónicos respecto de los métodos de separación tradicionales (McCalley, 2017).

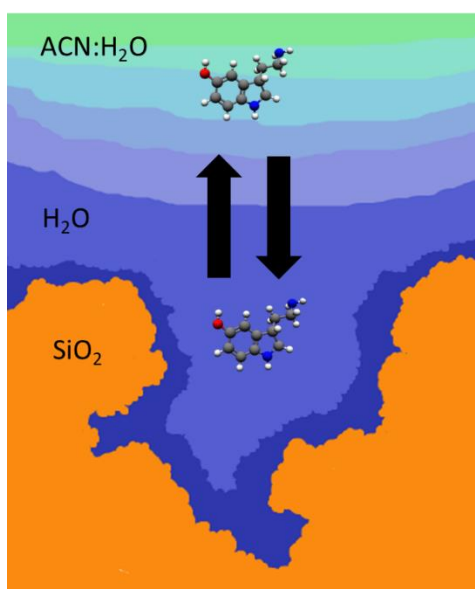


Figura 8. Esquema del mecanismo de interacción HILIC.

Como se ha comentado anteriormente, en HILIC se utiliza una fase móvil de carácter hidro-orgánico, generalmente compuesta por un disolvente orgánico en un determinado porcentaje (60-95 %) mezclado con agua o una disolución tapón (5-40 %). El porcentaje de disolución tampón en la fase móvil definirá el espesor y la composición de la capa acuosa formada alrededor de la fase estacionaria; se requiere un mínimo del 2 % para su formación (Taraji et al., 2018).

Normalmente, para la fase móvil se emplea como disolvente orgánico acetonitrilo o etanol y un tampón formiato o acetato de amonio. El pH y la fuerza iónica de la disolución también afectan a la separación cromatográfica, ya que según el pH de la fase móvil los analitos pueden estar en forma iónica y por tanto interaccionar más o menos con la fase estacionaria. La fuerza iónica afecta a las interacciones electroestáticas entre los analitos y la fase estacionaria, observándose un incremento de la retención de los analitos polares y neutros al incrementar la fuerza iónica de la disolución tampón (McCalley, 2017).

Respecto a la fase estacionaria, ésta debe tener un carácter hidrofílico que permita adsorber las moléculas de agua y se pueda crear la capa hidrofílica sobre su superficie. Desde la introducción de la HILIC se han diseñado diferentes fases estacionarias sobre soportes de sílice, polímeros o materiales híbridos funcionalizados con moléculas con grupos polares como diol, amina, amino, ciano, urea, triazol, aminoácidos, péptidos, PEG, poli(succinimida) y sus derivados, sulfoalquilbetaína, ciclodextrina, polivinilalcohol, pentafluorofenil-propil o líquidos iónicos (Taraji et al., 2018).

En la presente tesis se ha empleado como fase estacionaria una columna rellena con partículas de sílice modificadas con sulfoalquilbetaína, un compuesto zwitterión que se ancla a la partícula de sílice por el extremo del grupo amino cargado positivamente, quedando el grupo sulfito (cargado negativamente) más alejado de la partícula de sílice. En la Figura 9 se muestra la estructura del compuesto empleado como fase estacionaria.

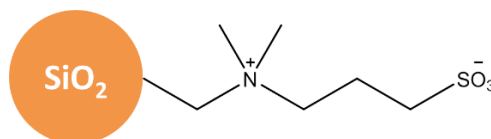


Figura 9. Representación de la superficie de la fase estacionaria ZIC-HILIC (R).

Al igual que las separaciones en fase reversa, la HILIC también ha sido utilizada en técnicas cromatográficas miniaturizadas. En la Tabla 5 se muestran los procedimientos analíticos descritos en la literatura que emplean HILIC-NanoLC para la separación y determinación de analitos polares. A causa de la escasa disponibilidad de fases estacionarias adecuadas para NanoLC, en la mayoría de los trabajos incluidos en la Tabla 5 la fase estacionaria utilizada ha sido sintetizada por los propios investigadores.

Además, se han descrito diferentes procedimientos en los cuales la extracción mediante IT-SPME también se realiza en modo HILIC, lo que favorece la extracción y preconcentración de los analitos polares. En esta línea, Wang, X. et al. (2017) sintetizaron un material sorbente monolítico a partir de urea y formaldehído que posteriormente modificaron con hialuronato de sodio. Para que la extracción tuviera lugar en modo HILIC, utilizaron un sistema de dos válvulas, una de ellas con un loop de acero inoxidable y la otra con el capilar relleno con el material sorbente, de manera que la muestra se cargaba en el loop de acero inoxidable para luego ser transportada por una bomba hasta el capilar de extracción.

Tabla 5. Procedimientos de HILIC-NanoLC descritos en la literatura.

Analitos	Matriz	Fase estacionaria	Fase móvil	Referencia
Efedrina y derivados	Patrones	Ciano, aminopropil, diol, y Luna-HILIC	ACN: NH ₄ CHO ₂ , pH 3	Aturki, D'Orazio, Rocco, Si-Ahmed & Fanali (2011)
Triazinas	Patrones	TEOS-MTEOS	ACN:H ₂ O	Silva, Bottoli & Collins, (2012)
Purinas/piridinas y nucleótidos	Hemoglobina bovina	Sulfoalquilbetaína	ACN:NH ₄ Ac	Chen et al. (2013)
N-glicanos	Plasma	Dietilaminoetil	ACN:H ₂ O	Tousi, Bones, Hancock & Hincapie (2013)
Nucleótidos y nucleósidos	Patrones	Silsesquioxanos corboxilados	ACN:NH ₄ Ac, pH 7	Kip, Demir & Tuncel (2017)
Nucleósidos, bases nitrogenadas y péptidos	Patrones	Sulfoalquilbetaína	ACN: NH ₄ CHO ₂ , pH 10	Liu, C. et al. (2017)
Aminoácidos	Zumo de frutas	B-ciclodextrina	ACN:MeOH:H ₂ O	Aydoğan (2018)
Urea y alantoína	Productos cosméticos	Sulfoalquilbetaína	ACN:H ₂ O	Wu, H. et al. (2018)
Glicopéptidos	Péptidos	Penta-hidróxido	ACN:H ₂ O	Kozlik, Goldman & Sanda (2018)
Péptidos complejos	Proteínas	Amida	ACN:NH ₄ Ac	Liu et al. (2019)

1.6 ANALITOS ESTUDIADOS

1.6.1 Pesticidas

Los pesticidas son sustancias químicas de origen natural o sintético que se utilizan para prevenir, contener o eliminar plagas, incluyendo los vectores de enfermedad humana o animal y las especies de plantas, animales o insectos que ocasionan un daño duradero o interfieren en la producción o almacenamiento de alimentos (Milne, 2018). Por tanto se trata de compuestos tóxicos para la plaga que se quiere combatir. Hoy en día, el uso de pesticidas se ha extendido a otras áreas diferentes al cultivo de alimentos, tales como el cuidado de zonas verdes urbanas o de campos deportivos, la fabricación de champús para animales, de materiales de construcción o en recubrimientos para barcos, todos ellos destinados a la prevención y/o eliminación de organismos indeseados (Nicolopoulou-Stamati et al., 2016). Los pesticidas se pueden clasificar según su toxicidad, estructura o uso. En la Tabla 6 se muestran las principales familias de pesticidas atendiendo a su estructura química, además de algunos ejemplos y el tipo de plagas sobre el que actúan.

En los estudios realizados en esta tesis se han utilizado pesticidas de diferentes familias, como triazinas, fenilureas, compuestos organofosforados o sulfonilureas. Cabe destacar que en algunos de ellos no solo se ha estudiado el pesticida aplicado, sino que también se han considerado algunos de sus principales productos de degradación. Este es el caso de la 2-hidroxiterbutilazina y la desetil-terbutilazina, dos productos de degradación de la terbutilazina, o el caso del metil-2-(aminosulfonil) benzoato y la 2-metoxi-4-metilamino-6-metil-1,3,5-triazina, que se originan en la degradación del tribenurón-metil.

Tabla 6. Clasificación de las principales familias de pesticidas y sus aplicaciones.

Familia de pesticidas	Usos	Ejemplos
Carbamatos y tiocarbamatos	Insecticida, fungicida	Carbaril, aldicarb, mancoceb, ditiocarbamato
Compuestos bipiridilos	Herbicida	Diquat, paraquat
Compuestos inorgánicos	Acaricida, rodenticida, herbicida	As ₂ O ₃ , fosfito de Mg, PbHAsO ₄ , Sb, Hg, Se, Tl.
Compuestos orgánicos del estaño	Insecticida, fungicida, acaricida	Tributilo de estaño, acetato de trifenilestaño, cihexatina,
Compuestos policlorofenoxiacéticos	Herbicida, fungicida	DNOC, dinoterb, dinocap
Difenil éter	Herbicida	Bifenox, piriproxifén
Dinitroanilinas	Herbicida, fungicida	Trifluralina, orizalín, pendimetalín
Fenilureas	Herbicida	Dinurón, fluometurón, linurón
Neonicotinoides	Insecticida	Imidacloprid, tiametoxam
Organoclorados	Insecticida	DDT, aldrín, endosulfán, dicofol
Organofosforados	Herbicida, insecticida	Fenamifós, fentiún, clorpirifós, fenitrotión
Piretroides	Insecticida	Cipermetrina, permetrina, fanvalerato
Sulfonilureas	Herbicida	Tribenurón-metil, tritosulfurón
Triazinas	Herbicida, fungicida	Atrazina, simazina, terbutilazina, Irgarol®-1051.

A continuación, se describen las diferentes familias de pesticidas utilizadas en los estudios realizados en esta tesis.

1.6.1.1 Triazinas

Las triazinas son uno de los tipos de herbicidas más utilizados. Su origen data de 1952, cuando J. R. Geighy desarrolló varios derivados triazínicos y propuso su uso como pesticidas. Su empleo creció a lo largo de la década de los 60 hasta convertirse en una de las familias de herbicidas más utilizadas en la actualidad. Su utilización no solo se limita al cultivo intensivo de maíz y cereales; también se utiliza para eliminar y evitar la aparición de maleza en carreteras y líneas ferroviarias o para combatir la esterilización del suelo o en la reforestación con pinos (Papadopoulos et al., 2012). Algunas triazinas también pueden usarse como fungicidas; este es el caso del irgarol®-1051, que se añade a las pinturas de los cascos de los barcos para evitar la acumulación de biota sobre su superficie (Lam et al., 2005).

Los herbicidas de tipo triazinas suelen aplicarse directamente al cultivo, depositándose sobre las hojas y la tierra, para posteriormente ser absorbidos por la planta a través de las hojas y las raíces. Una vez absorbido, el herbicida actúa inhibiendo la reacción de Hill y la absorción de CO₂ durante la fotosíntesis, ocasionando la muerte de la planta (Cañero et al., 2011). Cabe destacar que este tipo de pesticidas afecta principalmente a plantas de menor tamaño, ya que las plantas de gran tamaño son capaces de metabolizarlos. Por tanto, los pesticidas tipo triazinas son en todo caso adecuados y de gran utilidad para el control de la maleza sin afectar a los cultivos.

Respecto a su estructura química, las moléculas de triazinas contienen un anillo similar al benceno con tres átomos de carbono reemplazados por tres átomos de nitrógeno. Los tres isómeros de la triazina se distinguen por las posiciones de los átomos de nitrógeno y reciben el nombre de 1,2,3-triazina, 1,3,4-triazina y 1,3,5-triazina. Este último isómero, que también se conoce como s-triazina, es el más importante puesto que la mayoría de los herbicidas tipo triazina derivan de él.

Los derivados de la s-triazina se forman por adición de sustituyentes en las posiciones 2, 4 y 6 del anillo. En la posición 2 se suele introducir un grupo funcional tipo cloruro, tioalquil o metoxi, mientras que en las posiciones 4 y 6 se enlazan grupos amino sustituidos. Las propiedades de físico-químicas de las triazinas derivadas de la s-triazina varían en función de los sustituyentes. Se trata de bases débiles cuyo pKa depende principalmente del grupo situado en la posición 2. En medio acuoso y en suelos pueden existir en forma neutra o protonada según el pH del medio en que se encuentran. Son además compuestos solubles en agua y de un marcado carácter polar (log Kow entre 1.9 y 4.0) lo cual dificulta su análisis. En la Tabla 7 se muestran las triazinas utilizadas en este trabajo, su estructura y las propiedades físico-químicas más relevantes para los estudios realizados en el presente trabajo. Cabe destacar que todas las triazinas utilizadas en los diferentes estudios derivan del isómero 1,3,5-triazina, a excepción de la metribuzina, cuya estructura se basa en el isómero 1,3,4-triazina.

Se estima que las plantas solo absorben el 0.1 % de la cantidad total de pesticida aplicado, mientras que el resto permanece en el medio ambiente. El exceso de herbicida tipo triazina que no es absorbido por las plantas se puede quedar depositado en el suelo durante un largo periodo de tiempo. Además, dado su carácter polar y su solubilidad en agua, las triazinas pueden ser desorbidas del suelo por el agua de lluvia o procedente del riego, y migrar hacia aguas superficiales o subterráneas (Stara et al., 2016). Asimismo, las triazinas en el medio ambiente pueden ser degradadas a través de diferentes mecanismos como la oxidación, la desalquilación o por reacciones de descloración (Sabik, Jeannot & Rondeau, 2000), dando lugar a productos de degradación que en la mayoría de casos son más perjudiciales, puesto que son más polares que el propio pesticida aplicado y presentan mayor movilidad en el medio ambiente. En esta tesis se han incluido algunos productos de degradación de los pesticidas atrazina, terbutilazina e irgarol®-1051 (Tabla 7).

Tabla 7. Estructura y log Kow de las triazinas y productos de degradación estudiados.

	Estructura	log Kow
Desisopropil-atrazina		1.36
M1 ^a		-
2-Hidroxi-terbutilazina		1.82
Simazina		2.40
Desetil-terbutilazina		2.30
Metribuzina		1.7
Atrazina		2.61
Propazina		2.93
Terbutilazina		3.21
Irgarol®-1051		3.10

a) M1: principal producto de degradación del Irgarol®-1051

Diferentes estudios ponen de manifiesto que las triazinas no solo perjudican a las plantas, sino que también afectan a otros seres vivos como peces, anfibios, mamíferos o seres humanos, ya que pueden actuar como disruptores hormonales y están relacionadas con la aparición de algunos tipos de cáncer (Hostovsky et al., 2015; Saka, Tada & Kamata, 2018; Ma et al., 2015; Tariba Lovakovíc et al., 2017; Mostafalou & Abdollahi, 2017). Por todo ello, diferentes organismos han establecido legislaciones para el control del contenido de este tipo de pesticidas en muestras de agua destinada al consumo humano, en agua ambiental y en alimentos. Por ejemplo, la Agencia de Protección Medioambiental de EE.UU. (EPA) establece $3 \mu\text{g L}^{-1}$ como la concentración máxima de atrazina permitida en muestras de agua destinada al consumo humano (United States Environmental Protection Agency, 2017). En cambio, en la Unión Europea la legislación es más estricta, puesto que se considera que un agua no es apta para el consumo humano cuando la concentración de cada triazina individualmente es superior a $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ o la suma total de las concentraciones de todos los pesticidas supera los $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ (Directiva 98/83/CE del Consejo del 3 de noviembre de 1998).

Para las aguas ambientales la normativa europea establece que la concentración máxima permitida para la atrazina es $0.6 \mu\text{g L}^{-1}$, y $1 \mu\text{g L}^{-1}$ para la terbutilazina y la simazina (Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, del 12 de agosto de 2013).

1.6.1.2 Sulfonilureas

Las sulfonilureas contienen en su molécula un átomo de azufre unido a dos átomos de oxígeno que actúa como puente entre un anillo de benceno, sustituido en posición orto al enlace con el azufre, y entre un anillo heterocíclico de triazina o piridina, con una o las dos posiciones meta sustituidas. En la Tabla 8 se muestran las sulfonilureas utilizadas en esta tesis y sus respectivos log Kow. Como se puede observar, se ha optado por trabajar con sulfonilureas polares con un anillo tipo triazínico.

Tabla 8. Estructura y log Kow de las sulfonilureas estudiadas.

Nombre	Estructura	log Kow
Iodosulfurón-metil		-0.7
Tritosulfurón		0.6
Tribenurón-metil		0.8
Triflusalurón-metil		3.1

Las sulfonilureas actúan impidiendo el desarrollo, crecimiento y expansión de la maleza. Su mecanismo de actuación se basa en la inhibición de la enzima acetohidroxiácido sintasa, clave para la síntesis de los aminoácidos ramificados valina, leucina e isoleucina.

Las sulfonilureas fueron comercializadas como herbicidas en año 1982 por la compañía Dupont Corporation. Su uso está destinado principalmente al control de la maleza en cultivos de cereales, frutas y verduras como arroz, cebada, lino, fresas, patatas o tomates. Desde su comercialización, se han desarrollado cerca de 40 sulfonilureas diferentes, y dado su alta eficacia y baja toxicidad para los mamíferos, su uso se ha extendido convirtiéndose en el segundo tipo de pesticidas más utilizado a nivel mundial después de los glifosatos. En el mercado se pueden encontrar actualmente más de 30 productos fitosanitarios que contienen sulfonilureas en su composición (Ni et al., 2018).

El uso masivo de este tipo de pesticidas se ha convertido en un problema ambiental, no solo por su alta persistencia en suelos, sino también a causa de su movilidad, ya que se trata de compuestos solubles en agua con una polaridad media-alta (Pergal et al., 20018). Se han encontrado restos de sulfonilureas en muestras atmosféricas, de suelo, agua y productos agrícolas (trigo, maíz, frutas o verduras) (Gure et al., 2004). Para proteger la salud del consumidor, la UE ha establecido unos valores máximos de residuo permitidos (MLR) para diferentes sulfonilureas en aquellos alimentos en cuyo cultivo se suelen emplear este tipo de herbicidas (R (CE) nº 396/2005 del Parlamento Europeo y la Comisión, del 23 de febrero de 2005). Sin embargo, en la actualidad las sulfonilureas no están catalogadas como contaminantes prioritarios en la legislación europea.

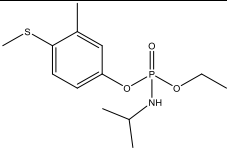
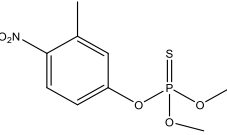
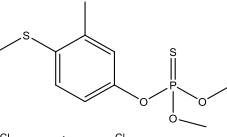
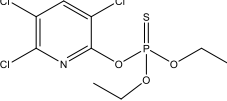
1.6.1.3 Compuestos organofosforados

Los compuestos organofosforados son moléculas complejas, normalmente aminas, ésteres o tioles derivados del ácido fosfórico. A pesar que el primer compuesto organofosforado fue sintetizado y descrito en el siglo XIX, estos productos no fueron utilizados ampliamente hasta la Segunda Guerra Mundial, cuando diferentes compuestos como el sarín y el tabún se utilizaron en la fabricación de gas nervioso. En la actualidad la utilización de estos compuestos está prohibida por el Tratado Internacional sobre Armas Químicas. Posteriormente se ha sintetizado una nueva generación de compuestos organofosforados de menor toxicidad que se emplean como insecticidas y herbicidas. Se estima que existen alrededor de 140 compuestos organofosforados diferentes que se emplean con esta finalidad (Eto, 2018).

Su mecanismo de actuación se basa en la inhibición de la enzima colinesterasa, produciendo un aumento de acetilcolina en las terminaciones motoras lo que puede llegar a ocasionar parálisis muscular y finalmente la muerte (Chowdhary, Bhattacharyya & Benerjee, 2014).

En la Tabla 9, se muestran la estructura y el log Kow de los compuestos organofosforados utilizados en la presente tesis.

Tabla 9. Estructura y log Kow de los pesticidas organofosforados estudiados.

Nombre	Estructura	log Kow
Fenamifós		3.2
Fenitrotión		3.4
Fentiión		4.0
Clorpirifós		4.7

1.6.1.4 Fenilureas

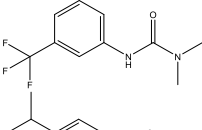
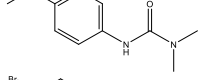
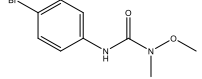
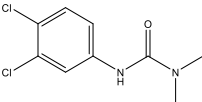
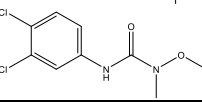
Al igual que las triazinas, los compuestos de la familia de las fenilureas actúan sobre el proceso de fotosíntesis de las plantas, inhibiendo el fotosistema II (Marlatt & Martyniuk, 2017). Desde la década de los 50 estos compuestos se han utilizado como herbicidas en el cultivo de algodón, zanahorias, patatas, soja o caña de azúcar, así como para evitar el crecimiento de maleza en líneas de ferrocarril u otro tipo de infraestructuras (Gatidou, Stasinakis & Latrou, 2015).

Se ha observado que estos compuestos pueden ser perjudiciales para los animales vertebrados especialmente peces y anfibios, ya que actúan como disruptores endocrinos (Orton, Lutz, Kloas & Routledge, 2009; Marlatt et al., 2017).

Las fenilureas son compuestos cuya estructura molecular consiste en un anillo de benceno unido a una molécula de urea y con sustituyentes en las posiciones meta y para respecto al carbono unido a la urea. Son sustancias solubles en agua que habitualmente son detectadas en aguas ambientales. Por ejemplo, Loos y colaboradores analizaron diferentes ríos de Europa y detectaron diurón en el 70 % de las muestras (Loos et al., 2009).

Como respuesta, en 2013 la Unión Europea incluyó a las fenilureas diurón e isoproturón en la lista de sustancias prioritarias, estableciendo una concentración máxima permitida en aguas continentales de $0.2 \mu\text{g L}^{-1}$ para el diurón y $0.3 \mu\text{g L}^{-1}$ para el isoproturón (Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, del 12 de agosto de 2013). Ambas fenilureas, catalogadas como sustancias prioritarias, así como otros compuestos de la misma familia, se han incluido en los diferentes estudios realizados en la presente tesis. En la Tabla 10, se muestran las sustancias tipo fenilurea seleccionadas, su estructura y su polaridad ($\log K_{ow}$).

Tabla 10. Estructura química y log Kow de los pesticidas tipo fenilurea estudiados.

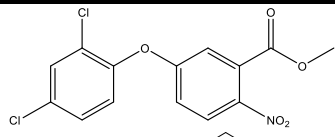
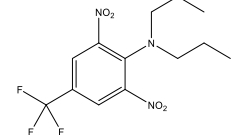
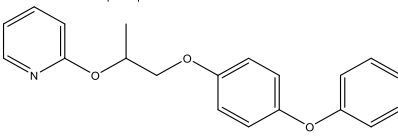
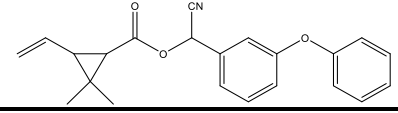
Nombre	Estructura	log Kow
Fluometurón		2.2
Isoproturón		2.5
Metobromurón		2.4
Diurón		2.68
Linurón		2.7

1.6.1.5 Otros pesticidas

En los diferentes estudios realizados a lo largo de la presente tesis se han incluido otros pesticidas como el bifenox, la cipermetrina, la trifluralina y el piriproxifeno. Los tres primeros están catalogados como contaminantes prioritarios en la legislación europea (Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, del 12 de agosto de 2013). La estructura de estos cuatro pesticidas y su log Kow se muestran en la Tabla 11.

El bifenox es un herbicida de la familia de los difenil éteres utilizado principalmente en el cultivo de cereales. Este compuesto actúa destruyendo la pared celular, inhibiendo la fotosíntesis y la acción de la protoporfirinógeno oxidasa, enzima que participa en la última etapa del proceso de síntesis de la clorofila (Almeida, Gomes, Langford, Thomas & Tollefsen, 2019).

Tabla 11. Estructura y log Kow de los pesticidas bifenox, trifluralina, piriproxifeno y cipermetrina.

Nombre	Estructura	log Kow
Bifenox		3.6
Trifluralina		5.34
Piriproxifeno		5.55
Cipermetrina		6.6

Como se puede observar en la Tabla 11, su estructura molecular consiste en un difenil éter con diferentes sustituyentes en los anillos aromáticos. Se trata de un pesticida con una elevada movilidad, a pesar de su relativa alta absorción en el suelo, característica que lo convierte en una sustancia perjudicial para el medio acuático (Dayan & Duke, 2010).

Otro de los pesticidas incluidos en este apartado es el piriproxifeno. Se trata de un compuesto derivado de la piridina (ver Tabla 11) que se emplea como insecticida, especialmente contra el mosquito (Truong, Gonnerman, Simonich & Tanguay, 2016). Su elevada eficacia se debe a su estructura similar a la hormona del crecimiento de los mosquitos, lo cual inhibe la metamorfosis de las larvas destruyéndolas (Invest & Lucas, 2008). Además, su baja toxicidad en humanos ha permitido su uso en depósitos de agua destinados al consumo humano para controlar y eliminar las poblaciones de mosquitos (Yunta, 2016).

Por su parte, la cipermetrina pertenece al grupo de los piretroides, se emplea para el control de plagas en agricultura y en el ámbito de la salud pública. Además, se trata de un ingrediente frecuente en los productos domésticos de higiene personal y en champús para mascotas (Ji et al., 2019; Teerlink, Hernández & Budd, 2017).

Su mecanismo de actuación es complejo. A grandes rasgos, la cipermetrina actúa como una neurotoxina que cierra los canales de sodio provocando que las células nerviosas no se cierren y el sodio circule libremente por su interior dando lugar a un estado de hiperexcitación, espasmos musculares incontrolados y, finalmente, la muerte (Boumba, Rallis & Vougiouklakis, 2017). Se trata de un producto con una baja toxicidad para la mayoría de vertebrados, aunque sí puede afectar a su calidad de vida ya que puede ocasionar alteraciones endocrinas y hormonales (Ji et al., 2019; Brander, Gabler, Fowler, Connon & Schlenk, 2016; Chen et al., 2019; Saillenfait et al., 2017).

Finalmente, la trifluralina pertenece a la familia de las dinitroanilinas. La estructura de este tipo de compuestos se caracteriza por estar formada por un anillo de benceno con diferentes sustituyentes entre ellos dos grupos nitro en posiciones orto respecto a una amina secundaria (Tabla 11). La trifluralina se emplea principalmente como herbicida en cultivos de algodón, soja, trigo y en general cultivos de semilla oleaginosa (Du et al., 2018).

Se trata de un compuesto tóxico que afecta a la división de las células mitóticas, actuando sobre el proceso de formación de microtúbulos y bloqueándolo y rompiendo estas estructuras celulares (Fernandes, Mazzeo & Marín-Morales, 2009). Como se ha mencionado anteriormente, se trata de una sustancia catalogada como prioritaria por la legislación de la Unión Europea. Esta clasificación viene motivada por su efecto genotóxico. Sargöl-Kiliç y colaboradores han estudiado recientemente la genotoxicidad de diferentes herbicidas tipo dinitroanilina, entre ellos la trifluralina. Los resultados obtenidos indican que en el rango de 1 a 500 μM la trifluralina daña los linfocitos periféricos de los humanos y las líneas celulares de fibroblastos en hámsteres. Por ello, puede clasificarse como una sustancia carcinogénica que daña el ADN ocasionando alteraciones cromosómicas (Sargöl-Kiliç, Aydin, Ündeğer-Bucurgat & Başaran, 2018).

1.6.2 Hidrocarburos aromáticos policíclicos

Los PAHs son compuestos químicos constituidos por dos o más anillos aromáticos de carbono sin heteroátomos ni sustituyentes. Este tipo de compuestos se forma principalmente por la combustión incompleta de cualquier tipo de materia orgánica. Su origen puede deberse a causas naturales o antropogénicas. Las principales fuentes de emisión naturales son las erupciones volcánicas y la biosíntesis directa por bacterias y plantas. Las emisiones antropogénicas se deben a la combustión y/o pirólisis incompleta de combustibles fósiles y a la industria del petróleo.

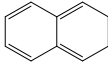
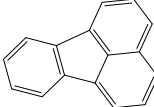
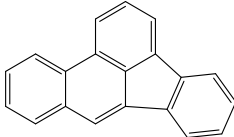
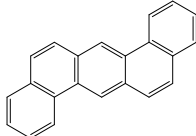
Los PAHs poseen una alta movilidad, ya que su semivolatilidad les permite viajar largas distancias antes de depositarse en suelos o en aguas superficiales. Por ello, y teniendo en cuenta que se trata de compuestos que se generan en multitud de actividades antropogénicas, se encuentran ampliamente extendidos en el medio ambiente, y en consecuencia los organismos se encuentran ampliamente expuestos a este tipo de sustancias. Se han detectado PAHs en multitud de matrices como aire, partículas en suspensión, suelos, sedimentos, aguas y biota (Campíns-Falcó et al., 2008). Es más probable encontrar los PAHs en muestras de suelo que de agua puesto que poseen una baja solubilidad, que se acentúa a medida que aumenta el número de anillos aromáticos.

Los PAHs son compuestos con una elevada toxicidad, y algunos de ellos han sido catalogados desde hace tiempo como carcinógenos, mutagénos y teratógenos, siendo el dibenzo[a,h]antraceno particularmente tóxico (Nikolaou, Kostopoulou, Lofrano & Meric, 2009). Dada su liposolubilidad, persistencia, estabilidad y baja polaridad, los PAHs tienden a bioacumularse en los seres vivos, depositándose en los tejidos grasos de los mismos.

Dada la toxicidad de estos compuestos, la Unión Europea considera a los PAHs contaminantes prioritarios, por lo que los ha incluido dentro de las normativas de calidad ambiental y seguridad alimentaria. Por ejemplo, se ha establecido que la concentración media anual de benzo[a]pireno en aguas superficiales no debe ser superior a $1,7 \cdot 10^{-4} \mu\text{g L}^{-1}$, y en biota a $5 \mu\text{g Kg}^{-1}$ (Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, del 12 de agosto de 2013). En aire el contenido máximo de benzo[a]pireno se ha limitado a 1 ng m^3 (Directiva 2004/107/CE del Parlamento Europeo y Consejo, del 15 de diciembre de 2004), y para las aguas destinadas a consumo humano la suma de las concentraciones de PAHs no debe ser mayor de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (Directiva 98/83/CE del Consejo, del 3 de noviembre de 1998). Respecto al contenido de PAHs en alimentos, la legislación europea establece que el contenido máximo de benzo[a]pireno no debe ser mayor de $2 \mu\text{g Kg}^{-1}$ en aceites y productos ahumados, ni superior a $1 \mu\text{g Kg}^{-1}$ en alimentos destinados a bebés y niños (R (UE) n° 835/2011 de la Comisión del 19 de agosto de 2011).

En esta tesis se han seleccionado diferentes PAHs que pueden considerarse ejemplos de compuestos capaces de establecer interacciones hidrofóbicas y de tipo π - π . En concreto se han seleccionado los compuestos naftaleno, fluoranteno, benzo[b]fluoranteno y dibenzo[a,h]antraceno, ya que presentan diferente número de anillos aromáticos y por tanto diferente hidrofobicidad (ver Tabla 12).

Tabla 12. Estructura y log Kow de los PAHs estudiados en esta tesis.

Nombre	Estructura	log Kow
Naftaleno		3.37
Fluoranteno		5.2
Benzo[b]fluoranteno		6.04
Dibenzo[a,h]antraceno		6.86

1.6.3 Ovoalbúmina

La ovoalbúmina es una de las principales proteínas del huevo y fue la primera proteína que se consiguió aislar (Huntington & Stein, 2001). Se trata de una glicoproteína formada por 385 aminoácidos (45 KDa) con un punto isoeléctrico de 4.5 (Nisbert, Saundry, Moir, Fothergill & Fothergill, 1981). Pertenece a la familia de las serpinas, sustancias inhibidoras de la actividad enzimática de las proteasas presentes en animales, plantas y virus. Sin embargo, la ovoalbúmina no tiene esta capacidad y se piensa que su función es servir como reserva de proteínas para el desarrollo del embrión dentro del huevo (Mann, 2017).

En la actualidad el huevo se emplea ampliamente en la industria alimentaria, utilizándose como gelificante en la producción de pasteles o como emulgente para producir mayonesas y mantequillas (Mine, 2015). No obstante, ciertas personas presentan alergia a este alimento, por lo que es necesario que los productores indiquen la presencia de restos de huevo en sus productos (R (CE) n° 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo, del 25 de octubre de 2011). Todo ello implica que la industria disponga de métodos eficientes de limpieza y métodos de control rápidos y fiables para la detección de restos de huevo, por ejemplo a través del análisis de ovoalbúmina, y de esta manera evitar la contaminación cruzada y garantizar la seguridad del consumidor Helbig, Zahn, Böttcher, Rohm & Majschak, 2018.

Una opción para el control de la eficacia de los procedimientos de limpieza en una industria que trabaja con huevos consiste en determinar la presencia de ovoalbúmina en las aguas de lavado después de cada etapa de limpieza. La concentración de proteína se utiliza como indicador de la eficiencia del proceso de limpieza.

A pesar de que existen diferentes procedimientos para la determinación directa de proteínas, como los ensayos ELISA (Galán-Malo et al., 2017), el procedimiento más común consiste en hidrolizar la proteína y determinar los aminoácidos libres generados. La hidrólisis se basa en digerir la proteína calentando a 100-150 °C en medio ácido o básico. Hay que tener en cuenta que a pH ácido se produce la destrucción parcial de los aminoácidos glutamina, cisteína y aspartato, así como la destrucción completa del triptófano (Akhlaghi, Ghaffari, Attar & Hoor, 2015). Sin embargo, estos aminoácidos no son destruidos cuando la hidrólisis se realiza en medio básico (Simonato, Moraes, Carrilho, Tavares y Kenndler, 2008). Otra opción es la utilización de enzimas para hidrolizar la proteína, pero este procedimiento requiere largos tiempos de incubación para su completa destrucción, siendo por ello poco práctico.

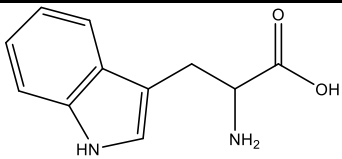
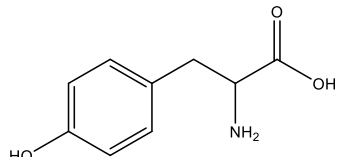
Respecto a la determinación de aminoácidos, en la literatura se pueden encontrar gran cantidad de procedimientos analíticos basados en LC, GC o electroforesis, acopladas a detectores de absorción (Akhlaghi et al., 2015; Ali Omar, Elbashir & Schimitz, 2017) de fluorescencia (Li et al., 2017; Sánchez-Machado, Chavira-Willys & López-Cervantes, 2018), electroquímicos (Tuma & Gojda, 2015) o de espectrometría de masas (Tsochatzis, Begoud, Gika, Karayannakidis & Kalogiannis, 2017; Rashaid, Harrington & Jackson, 2015; Simonato et al., 2008). No obstante, la mayoría de estos procedimientos requieren de una etapa de derivatización previa para incrementar la sensibilidad y la resolución cromatográfica puesto que se trata de compuestos con bajo peso molecular y elevada polaridad.

Se han propuesto diferentes reactivos derivatizantes como el cloruro de 4-N,N-dimetilaminoazobenceno-4'sulfonil (Akhlaghi et al., 2015), el 2,4-dinitrobenceno (Wu et al., 2014) o el 9-fluorenilmetil cloroformiato (Passos, Cieslarova y Simonato, 2016) para incrementar la sensibilidad de la determinación de aminoácidos empleando detectores de absorción UV-vis. La formación de derivados fluorescentes se ha realizado empleando reactivos como el 6-aminoquinolin-N-hidroxisucinimidil carbamato (Li et al., 2017), el o-ftaldialdehído (Perucho et al., 2015; Fonseca, Cristóvãoa & Alves, 2018) o el 4-fluoro-7-nitro-1,2,3-benzoxidiazol (Li, Kuroki, Funatsu & Tsunoda, 2018).

A pesar de que la espectrometría de masas es la técnica más utilizada para la determinación de aminoácidos, ya que se obtiene una satisfactoria sensibilidad y selectividad (Song, Xu, Kuroki, Liao & Tsonda, 2018), también se requiere formar compuestos derivados cuando se emplea GC para la separación cromatográfica. La bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida es el compuesto más frecuentemente utilizado como reactivo derivatizante en este caso (Rashaid et al., 2015).

En esta tesis se propone la determinación de ovoalbúmina mediante el hidrólisis de la proteína y la posterior determinación de los aminoácidos triptófano y tirosina. Para ello se emplea IT-SPME-NanoLC que proporciona la suficiente sensibilidad para la determinación de ambos aminoácidos mediante absorción UV sin necesidad de derivatización. La estructura de ambos aminoácidos y su log Kow se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Estructura y log kow de los aminoácidos triptófano y tirosina.

Nombre	Estructura	log Kow
Triptófano		-1.061
Tirosina		-2.04

1.6.4 Compuestos de amonio cuaternario (QACs)

Los QACs son surfactantes catiónicos usados en la fabricación de productos de limpieza, telas, cosméticos o desinfectantes. El compuesto más utilizado es el cloruro de benzalconio (BAC), formado por una mezcla de los homólogos de cloruro de n-alkilbencildimetilamonio, con n en un rango de 8 a 18, siendo los homólogos C₁₂, C₁₄ y C₁₆ los predominantes. Su eficacia como biocida y surfactante depende de la proporción y concentración de los diferentes homólogos. En general, el homólogo C₁₂ actúa como fungicida y se encuentra en mayor proporción. Los homólogos C₁₄ y C₁₆ actúan como bactericidas gram-postivo y gram-negativo, respectivamente (Prieto-Blanco et al., 2016). Otro tipo de QACs ampliamente utilizado son los denominados compuestos de dialquildimetilamonio, siendo el didecildimetilamonio (DDAC) el más representativo. Las estructuras moleculares de los diferentes QACs utilizados en esta tesis se muestran en la Figura 10.

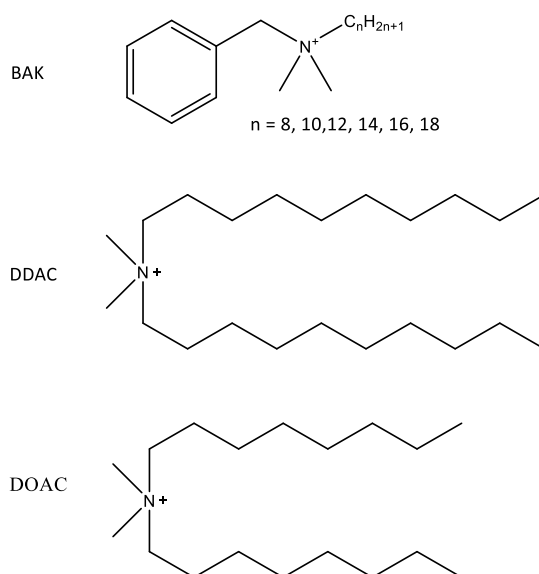


Figura 10. Estructuras moleculares de los compuestos de amonio cuaternario estudiados en esta tesis. DOAC: dioctildimetilamonio.

Los QACs son vertidos al medio ambiente a través de las aguas residuales domésticas e industriales. La presencia de estos compuestos en el medio ambiente es preocupante dado que pueden resultar muy tóxicos para los organismos acuáticos. Por ello, se han desarrollado diferentes procedimientos analíticos para la determinación de QACs en diferentes matrices ambientales como suelos, sedimentos, aguas ambientales y aguas residuales (Zhang, C. et al., 2015). Además, estos compuestos pueden ser perjudiciales para ciertas personas ya que pueden causar asma y alergia cutánea. Asimismo, dado el efecto biocida de los QACs, estos compuestos se emplean habitualmente como desinfectantes en la industria alimentaria, siendo necesario controlar la presencia de residuos en alimentos y proteger así la salud del consumidor. La Unión Europea ha establecido en 0.1 mg Kg⁻¹ el límite máximo residual permitido de BAC y DDAC en productos alimentarios (R (UE) nº 1119/2014 de la Comisión del 16 de octubre de 2014).

La LC es la técnica más utilizada para el análisis de QACs, aunque debido a la ausencia de grupos cromóforos en algunos de ellos, como el DDAC, se requieren detectores de espectrometría de masas. Se han descrito diferentes procedimientos para la identificación de QACs en matrices ambientales (Prieto-Blanco, Moliner-Martínez & Campíns-Falcó, 2013; Idkowiak et al., 2017), en alimentos (Xian et al., 2016; Slimani et al., 2017) o en productos industriales (Prieto-Blanco et al., 2016). Sin embargo, en algunos casos dichos procedimientos son tediosos, y no son válidos para aplicaciones in-situ y de respuesta rápida como podría ser en las etapas de limpieza de la industria, bien durante la optimización o bien para comprobar que no quedan restos de la limpieza y se puede reiniciar la producción. Para la determinación rápida e in-situ se suelen emplear volumetrías de dos fases (Tsubouchi, Mitsushio & Yamasaki, 1991), así como métodos colorimétricos basados en la formación de pares iónicos seguidos de la extracción de éstos con un disolvente orgánico, (Idouhar & Tazerouti, 2008) o la formación de complejos coloreados (Afkhami, Nematollahi Madrakian & Hajihadi, 2011).

En esta tesis se ha desarrollado un procedimiento in-situ para la determinación de QACs. Adicionalmente, se propone la utilización de IT-SPME fuera de línea para extraer los detergentes e incrementar la sensibilidad en su detección y determinación.

La clorofila se encuentra en los organismos fotosintéticos como plantas y algas, siendo una biomolécula clave en el proceso de fotosíntesis. La monitorización del contenido de clorofila se incluye en los programas de evaluación de la calidad del agua en lagos, embalses y pozos, ya que se puede utilizar como medida indirecta de la biomasa de algas e indicador del estado trófico de las aguas. El crecimiento de algas planctónicas en agua está relacionado con la presencia de nutrientes (nitratos y fosfatos principalmente), la temperatura y la luz. Por tanto, la concentración de clorofila fluctúa estacionalmente o incluso diariamente según las condiciones ambientales y la profundidad.

Para la monitorización de la cantidad de clorofila se han propuesto diferentes índices espectrales de la vegetación (Croft et al., 2014a; Sonobe and Wang, 2017). Uno de ellos es el denominado Macc01 (Croft et al., 2014b), que se basa en la medida de la reflectancia en la región del infrarrojo-cercano, calculado como $Macc01 = (R_{780} - R_{710}) / (R_{780} - R_{680})$. Otro método descrito en bibliografía es el índice diferencial de vegetación normalizado (NDVI) (Pietrzykowski, Stone, Pinkard & Mohammed, 2006). Este método está relacionado con el estado de salud de las plantas y el consumo de nitrógeno; por tanto, también está relacionado con la cantidad relativa de clorofila. La ecuación utilizada en dicho procedimiento es $NDVI = (R_{800} - R_{680}) - (R_{800} + R_{680})$.

Por otra parte, el contenido de clorofila en las hojas se puede utilizar como indicador del estado de salud de las plantas (Barchanska et al., 2014), y por tanto permiten evaluar la toxicidad de algunos pesticidas. Muchos de estos compuestos actúan sobre el proceso de fotosíntesis destruyendo la clorofila y carotenoides de las hojas, generando radicales libres que destruyen las membranas celulares produciendo necrosis de las plantas y finalmente la muerte.

En esta tesis se ha desarrollado un método no invasivo para la determinación de clorofila a basado en la medida de la reflectancia difusa directamente sobre la hoja de la planta. Posteriormente, el registro obtenido se trata matemáticamente haciendo uso del método del punto H (HPCIM). El método desarrollado se ha empleado para la monitorización del estado de salud de plantas de espinacas tratadas con los pesticidas terbutilazina, trifluralina y clorpirifós.

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS

En las últimas décadas ha crecido significativamente la preocupación por el medio ambiente. Esto ha motivado un cambio en los diferentes ámbitos de la sociedad hacia prácticas más sostenibles y respetuosas con el entorno. En el campo de la Química Analítica, en el año 2013 Gałuszka y colaboradores definieron los 12 principios de la QAV, que demandan nuevas metodologías e incluyen las directrices a seguir para desarrollarlas. Por otro lado, la sociedad exige una mayor seguridad lo que implica, entre otras actividades, el control de contaminantes emergentes y legislados. También esta demanda necesita del desarrollo de nuevas metodologías en la dirección indicada. Por todo ello se requiere el desarrollo de técnicas analíticas más sostenibles que permitan ampliar la polaridad de la aplicación de la cromatografía líquida en este campo.

Con ese fin se ha desarrollado la SPME, una alternativa más sostenible que las técnicas de extracción convencionales (extracción líquido-líquido y SPE). Dentro de las diferentes técnicas de SPME, la IT-SPME se postula como una de las más sostenibles, puesto que se puede implementar en línea al sistema cromatográfico, reduciéndose el tiempo de análisis, el consumo eléctrico y la cantidad de disolventes y residuos generados respecto de otros procedimientos de SPME. Por otro lado, la miniaturización de las técnicas cromatográficas supone un incremento significativo de la sensibilidad y un menor consumo de disolventes, siendo por tanto medioambientalmente más sostenible. En consecuencia, el uso de metodologías basadas en el acoplamiento de IT-SPME a sistemas de LC miniaturizada, como CapLC y NanoLC es una opción interesante puesto que permite desarrollar procedimientos sensibles con un menor impacto ambiental.

Por ello se requiere un estudio más profundo de las diferentes configuraciones que permiten acoplar IT-SPME a LC miniaturizada. Además, en el mercado existe un número muy reducido de columnas de extracción comerciales compatibles con IT-SPME-NanoLC, siendo necesario el desarrollo de nuevas fases extractivas.

Atendiendo a lo expuesto anteriormente, la presente tesis tiene como objetivo principal el estudio del acoplamiento IT-SPME-NanoLC y el desarrollo de nuevas fases de extracción para IT-SPME acoplada a CapLC y NanoLC, especialmente para el análisis de compuestos polares, así como explorar otras técnicas fuera de línea que hagan uso de SPME. Para ello, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Desarrollar métodos analíticos basados en IT-SPME para la determinación de herbicidas tipo triazina en diferentes matrices acuosas empleando como fase de extracción columnas capilares comerciales de GC sin modificar y modificadas con c-CNTS.
- Explorar nuevas fases de extracción para IT-SPME acoplada a CapLC y NanoLC basadas en el recubrimiento de una columna capilar de sílice fundida con un polímero de silicio; evaluar la influencia en su capacidad de extracción para diferentes contaminantes ambientales, de su modificación con NPs metálicas y de óxidos metálicos.
- Sintetizar dentro de un capilar de sílice un material monolítico con grupos borato para la extracción selectiva de herbicidas polares mediante IT-SPME-NanoLC-DAD.
- Consolidar el acoplamiento de la IT-SPME a NanoLC, y demostrar su utilidad como alternativa a otras técnicas menos sostenibles; evaluar diferentes configuraciones para acoplar ambos sistemas y desarrollar nuevas metodologías de análisis basadas en este acoplamiento, tanto en fase reversa como en HILIC.
- Explorar la utilización de cenizas como material sorbente sostenible y demostrar sus posibilidades utilizando IT-SPME fuera de línea.
- Plantear metodologías de análisis para la determinación de contaminantes emergentes y prioritarios en muestras ambientales, prestando especial interés a sus procesos de degradación y a los metabolitos generados, así como estudiar su influencia en la salud de la vegetación.
- Desarrollar metodologías de análisis in-situ que permitan la determinación de QACs en muestras de interés para la industria.

El desarrollo de la presente tesis ha sido posible gracias a la beca predoctoral FPI 2015 y a los proyectos de investigación concedidos al grupo MINTOTA que se detallan a continuación:

- FPI 2015/BES-2015-074030 *Ayudas para contratos predoctorales para la formación de doctores 2015*, Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO).
- Proyecto CTQ2011/26760, concedido por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), *“Nuevas estrategias de análisis en técnicas cromatográficas miniaturizadas que incorporan la microextracción en fase sólida en tubo con nuevos (nano)materiales”*. (3 años)
- Proyecto PROMETEO 2012/045, concedido por la Generalitat Valenciana - Programa Prometeo para grupos de investigación de Excelencia, *“Desarrollo de nuevas estrategias para el diseño de dispositivos de análisis in situ”*. (4 años)
- Proyecto CTQ2014-53916-P concedido por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), UE y FEDER – Programa Estatal de Fomento de la Investigación Científica y Técnica de Excelencia Subprograma Estatal de Generación de Conocimiento, *“Desarrollo de nuevas estrategias para el diseño de técnicas de cromatografía líquida miniaturizada en línea: nanopartículas, contaminación secundaria”*. (3 años)
- Proyecto PROMETEO2016/109, concedido por la Generalitat Valenciana - Programa Prometeo para grupos de investigación de Excelencia, *“Desarrollo de nuevas estrategias para el diseño de dispositivos de análisis in situ: nano y biomateriales”*. (4 años)
- Proyecto CTQ2017-90082-P, concedido por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, *“Microextracción en fase sólida en tubo acoplada en línea a nanocromatografía líquida: nuevas oportunidades para/desde la nanoescala y cromatografía líquida”*. (4 años)

Los resultados obtenidos y el conocimiento adquirido a lo largo del desarrollo de la tesis, ha dado lugar a la publicación de 9 artículos científicos, más uno enviado y otro pendiente de ser enviado para su publicación, dos capítulos de libro y un capítulo de enciclopedia.

- Moliner-Martínez, Y., **Serra-Mora, P.**, Verdú-Andrés, J., Herráez-Hernández, R. y Campíns-Falcó P. (2015) Analysis of polar triazines and degradation products in waters by in-tube solid-phase microextraction and capillary chromatography: an environmentally friendly method. *Anal. Bioanal. Chem.*, 407, 1485-1497. Factor Impacto (JCR 2018): 3.286
- Jornet-Martínez, N., **Serra-Mora, P.**, Moliner-Martínez, Y., Herráez-Hernández, R. y Campíns-Falcó, P. (2015) Evaluation of carbon nanotubes functionalized polydimethylsiloxane based coatings for in-tube solid phase microextraction coupled to capillary liquid chromatography. *Chromatography*, 2, 515-528. Open Acces.
- **Serra-Mora, P.**, Moliner-Martínez, Y., Herráez-Hernández, R., Verdú-Andrés, J. y Campíns-Falcó, P. (2016) Simplifying iron determination with o-phenantroline in food ashes using 2-nitrophenol as an acid-base indicator. *Food Anal. Methods*, 9, 1150-1154. Factor Impacto (JCR 2018): 2.413.
- Pla-Tolós, J., **Serra-Mora, P.**, Hakobyan, L., Molins-Legua, C., Moliner-Martínez, Y. y Campíns-Falcó, P. (2016) A sustainable on-line CapLC method for quantifying antifouling agents like irgarol-1051 and diuron in water samples: estimation of the carbon footprint. *Sci. Total Environ.*, 569-570, 611-618. Factor Impacto (JCR 2018): 5.589.
- **Serra-Mora, P.**, Jornet-Martínez, N., Moliner-Martínez, Y. y Campíns-Falcó, P. (2017) In tube-solid phase microextraction-nano liquid chromatography: application to the determination of intact and degraded polar triazines in waters and recovered struvite. *J. Chromatogr. A*, 1513, 51-58. Factor Impacto (JCR 2018): 3.858.
- Muñoz-Ortuño, M., **Serra-Mora, P.**, Herráez-Hernández, R., Verdú-Andrés, J. y Campíns-Falcó, P. (2017) A new tool for direct non-invasive evaluation of chlorophyll a content from diffuse reflectance measurements. *Sci. Total Environ.*, 609, 370-376. Factor Impacto (JCR 2018): 5.589.

- **Serra-Mora, P.**, Moliner-Martínez, Y., Molins-Legua, C., Herráez-Hernández, R., Verdú-Andrés, J. y Campíns-Falcó, P. (2017). Trends in online Intube solid phase microextraction. En E. Ibañez y A. Cifuentes (ed), *Green extraction techniques: principles, advantages and applications*, volume 76, 10st edition (pp 427-461), Ámsterdam, Países Bajos: Elsevier.
- Moliner-Martínez, Y., **Serra-Mora, P.**, Verdú-Andrés, J., Molins-Legua, C., Herráez-Hernández, R. y Campíns-Falcó, P. (2017). Application of nanomaterials in solid and liquid microextraction. En M. Valcárcel, S. Cárdenas y R. Lucena (ed), *Analytical microextraction techniques* (pp 135-166), Sharjah, Emiratos Árabes Unidos: Bentham Science Publishers.
- **Serra-Mora, P.**, Muñoz-Ortuño, M., Gallego-Prieto, P., Verdú-Andrés, J., Herráez-Hernández, R. y Campíns-Falcó, P. (2018) Cotton swabs supported in-situ assay for quaternary ammonium compounds residues in effluents and surfaces. *Food Control*, 84, 419-428. Factor Impacto (JCR 2018): 4.248.
- **Serra-Mora, P.**, Rodríguez-Palma, C.E., Verdú-Andrés, J., Herráez-Hernández, R. y Campíns-Falcó, P. (2018) Improving the on-line extraction of polar compounds by IT-SPME with silica nanoparticles modified phases. *Separations*, 5, 10. Open Access.
- Campíns-Falcó, P., Herráez-Hernández, R. y **Serra-Mora, P.** (2018). Liquid chromatography-instrumentation. En P. Worsfold, A. Townshend y C. Poole (ed), *Encyclopedia of Analytical Science 2nd edition* (pp 205-213), Ámsterdam, Holanda: Elsevier.
- **Serra-Mora, P.**, García-Narbona, P., Verdú-Andrés, J., Herráez-Hernández, R. y Campíns-Falcó, P. (2019) Exploring new extractives phases for in-tube solid phase microextraction coupled to miniaturized liquid chromatography. *Separations*, 6, 12. Open Access.

- **Serra-Mora, P.**, Herráez-Hernández, R. y Campíns-Falcó, P. Bimodal copper oxide nanoparticles doped phase for extraction of highly polar compounds by in-tube solid-phase microextraction coupled on-line nano-liquid chromatography. Enviado.
- **Serra-Mora, P.**, Herráez-Hernández, R. y Campíns-Falcó, P. Minimizing the impact of sample preparation on analytical results by on-line coupled in-tube solid phase microextraction and nano-liquid chromatography: study of the degradation of tribenuron-methyl in environmental waters. Pendiente de envío.

Durante el desarrollo de la presente tesis los resultados obtenidos se han divulgado mediante poster o presentación oral en diferentes congresos nacionales e internacionales. Los trabajos presentados han sido:

- Pla-Tolós, J., **Serra-Mora, P.**, Moliner-Martínez, Y., Verdú-Andrés, J. Herráez-Hernández, R. y Campíns-Falcó, P. (2014). Degradation products in water by in-tube solid-phase microextraction and capillary chromatography: an environmentally friendly method. *5th SCARCE International Conference: River Conservation Under Water Scarcity: Integration of water quantity and quality in Iberian rivers under global change*. Tarragona, España, congreso Internacional. Póster.
- Moliner-Martínez, Y., Argente-García A., Muñoz-Ortuño, M., **Serra-Mora, P.** y Campíns-Falcó, P. (2014). A new approach for in-tube solid-phase microextraction.nano-LC coupling: evaluation of carbón nanotubes based adsorbent phases for environmental analysis. *30th International Symposium on Chromatography*. Salzburg, Austria. Congreso internacional. Póster.
- Moliner-Martínez, Y., **Serra-Mora, P.**, Jornet-Martínez, N., Herráez-Hernández, R., Verdú-Andrés, J. y Campíns-Falcó, P. (2015). Carbon nanotubes functionalized polydimethylsiloxane based sorbent phase for in-tube solid phase microextraction coupled to capillary liquid chromatography. *XX Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica*. Santiago de Compostela, España, congreso nacional. Póster.

- Campíns-Falcó, P., Moliner-Martínez, Y., Molins-Lagua, C., Herráez-Hernández, R., **Serra-Mora, P.** y Argente-García, A. (2016). New strategies for designing miniaturized on-line liquid chromatographic techniques by coupling in tube solid phase microextraction. *18th International Symposium on Advances in Extraction Technologies & 22nd International Symposium on Separation Science*. Torún, Polonia, Congreso internacional. Presentación oral.
- **Serra-Mora, P.**, Jornet-Martínez, N., Muñoz-Ortuño, M., Verdú-Andrés, J., Herráez-Hernández, R. y Campíns-Falco, P. (2016). IT-SPME-nanoLC-DAD for determination triazines in recovered struvite from waste treatment plants. *NET-SCARCE International Conference. Rivers under water scarcity: threats and challenges*. Barcelona, España, congreso internacional. Póster.
- Moliner-Martínez, Y., Argente-García, A., Pla-Tolos, J., **Serra-Mora, P.**, Hakobyan, L. y Campíns-Falcó, P. (2016) Evaluation of in-tube solid phase microextraction coupled to capillary LC with mass spectrometry for the estimation of irgarol-1051 and its polar transformation products in water. *NET-SCARCE International Conference. Rivers under water scarcity: threats and challenges*. Barcelona, España, congreso internacional. Póster.
- **Serra-Mora, P.**, Jornet-Martínez, N., Moliner-Martínez, Y., Herráez-Hernández, R. y Campíns-Falcó, P. (2016). IT-SPME-CapLC vs IT-SPME-nanoLC: comparison for the determination of polar triazines. *2nd Caparica Christmas Conference on Sample Pretreatment*. Caparica, Portugal, congreso internacional. Póster.
- Moliner-Martínez, Y., **Serra-Mora, P.**, Hakobyan, L., Herráez-Hernández, R., Verdú-Andrés, J. y Campíns-Falcó P. (2016). New extraction phases for IT-SPME. *2nd Caparica Christmas Conference on Sample Pretreatment*. Caparica, Portugal, congreso internacional. Presentación oral.

- **Serra-Mora, P.**, Herráez-Hernández, R. y Campíns-Falcó, P. (2017). Hybrid silica-based coatings modified with nanoparticles for the extraction of polar herbicides by in-tube solid-phase microextraction coupled to nano-liquid chromatography. *19th International Symposium on Advances in Extraction Technologies*. Santiago de Compostela, España, congreso internacional. Póster.
- Muñoz-Ortuño, M., **Serra-Mora, P.**, Verdú-Andrés, J., Herráez-Hernández, R. y Campíns-Falcó, P. (2017). In-situ extraction and sequentially determination of quaternary ammonium compounds residues in effluents. *19th International Symposium on Advances in Extraction Technologies*. Santiago de Compostela, España, congreso internacional. Póster.
- Moliner-Martínez Y., Hakobyan, L., **Serra-Mora, P.**, Molins-Legua, C., Herráez-Hernández, R., Verdú-Andrés, J. y Campíns-Falcó, P. (2017). High performance extractive phase for IT-SPME. *19th International Symposium on Advances in Extraction Technologies*. Santiago de Compostela, España, congreso internacional. Presentación oral.
- **Serra-Mora, P.**, Herráez-Hernández, R. y Campíns-Falcó, P. (2017). Combined metal oxide nanoparticles modified coatings for the extraction of polar herbicides by in-tube solid phase microextraction. *XXI Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica*. Valencia, España, congreso nacional. Poster.
- **Serra-Mora, P.**, Herráez-Hernández, R., Verdú-Andrés, J. y Campíns-Falcó, P. (2018). New Materials for sample preparation in on-line coupled in-tube solid-phase microextraction and nano-liquid chromatography: degradation of tribenuron-methyl in environmental waters. *32nd International Symposium on Chromatography*. Cannes-Mandelieu, Francia, congreso internacional. Póster.







- Herráez-Hernández, R., **Serra-Mora, P.**, Verdú-Andrés, J. y Campíns-Falcó, P. (2018). New metal and metal oxide nanoparticles modified polymeric materials for on-line extraction of polar compounds. *32nd International Symposium on Chromatography*. Cannes-Mandelieu, Francia, congreso internacional. Póster.
- Herráez-Hernández, R., **Serra-Mora, P.** y Campíns-Falcó, P. (2019) Nano liquid chromatography coupled to capillaries doped with metal and metal oxide nanoparticles for on-line extraction. *International Congress on Analytical Nanoscience and Nanotechnology – IX NyNA*. Zaragoza, España, congreso internacional. Presentación oral.
- **Serra-Mora, P.**, Herráez-Hernández, R. y Campíns-Falcó, P. (2019) CuO nanoparticles for in-tube solid-phase microextraction of tryptophan and tyrosine from hydrolyzed ovalbumin by hydrophilic nano liquid chromatography. *International Congress on Analytical Nanoscience and Nanotechnology – IX NyNA*. Zaragoza, España, congreso internacional. Póster.
- **Serra-Mora, P.**, Herráez-Hernández, R., Combes, A., Pichon, V. y Campíns-Falcó, P (2019) Boronate affinity monolithic columns for extraction of polar pesticides by in-tube solid phase microextraction. *25th International Symposium on Separation Sciences*. Lodz, Polonia, congreso internacional. Póster.







CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA







3.1 REACTIVOS







En la Tabla 14 se muestra el listado de los diferentes reactivos, todos ellos de grado analítico, utilizados en el desarrollo de la tesis, junto con la casa comercial y los pictogramas de seguridad según el reglamento R (CE) n° 1272/2008 del Parlamento y del Consejo, del 16 de diciembre de 2008 sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas.

El principal producto de degradación del irgarol®-1051, 2-metiltio-4-terc-butilamoni-6-amino-s-triazina (M1), se obtuvo por hidrólisis del pesticida con cloruro de mercurio (Liu et al., 1999)

Tabla 14. Listado de reactivos, casa comercial y pictogramas de seguridad  Inflamable,  corrosivo,  tóxico,  efectos adversos en dosis altas,  peligroso para la salud,  peligroso para el medio ambiente. 1) Sigma: Sigma-Aldrich; Dr. Ehrenst: Dr Ehrenstorfer.

Compuesto	Casa comercial ¹						
1,3-Diciclohexilcarbodiimida	Sigma		x	x			
2-Hidroxi-terbutilazina	Dr Ehrenst.					x	
2-Nitrofenol	Merk					x	
Acetato de etilo	Sigma	x				x	
Acetona	Panreac	x				x	
Acetonitrilo	VWR	x				x	
Ácido Acético	Sigma	x	x				
Ácido ascórbico	VWR						
Ácido bórico	Panreac						x
Ácido cítrico	Panreac					x	
Ácido clorhídrico	Sharlab		x			x	
Ácido Nítrico	Panreac		x			x	
Ácido Sulfúrico	Panreac		x				
Ag NPs (20, 40 nm) citrato	Sigma						
AIBN	Sigma	x				x	
Al ₂ O ₃ NPs (<50 nm)	Sigma						
APTES	Sigma		x			x	
Atrazina	Dr. Ehrenst					x	x
Au NPs (5-40 nm) citrato	Sigma						
Au NPs (5-40 nm) fosfato	Sigma						
BAC	Betelgeux		x			x	x
Bifenox	Sigma						x

Compuesto	Casa comercial ¹						
Cipermetrina	Sigma			x		x	x
Clorofila	Fluka						
Clorpirifós	Sigma			x			x
Cromo azurol S	Merk						
CuO NPs (40 nm)	Sigma						x
DDAC	Betelgeux		x	x			x
Desetil-terbutilazina	Dr Ehrenst.				x		
Desisopropil-atrazina	Sigma				x		
Dimetilformamida	Panreac	x			x	x	
Diurón	Sigma				x	x	x
Divinilbenceno	Sigma		x		x		
DMSO	Sigma				x		
DOAC	Betelgeux		x	x			x
Dodecanol	Sigma				x		x
Dodecilsulfato de sodio	Panreac	x	x		x		
Etanol	VWR	x			x		
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ · 6 H ₂ O	Sigma						
Fe ₂ O ₃ NPs (35 nm)	Sigma				x		
Fenamifós	Dr Ehrenst.			x			x
Fenitrotión	Sigma			x			x
Fentiión	Dr Ehrenst.			x		x	x
Fluometurón	Dr Ehrenst.				x		
Fluoranteno	Dr Ehrenst.				x		x
Glutaraldehído	Sigma		x		x	x	x
HgCl ₂	Sigma		x	x		x	x
Hidróxido sódico	Sigma		x				
Iodosulfurón-metil-sodio	Sigma						x
Irgarol®-1051	Sigma				x		x
Isoproturón	Dr Ehrenst.				x	x	x
KAl(SO ₄) · 12H ₂ O	Sharlab						
Linurón	Dr Ehrenst.				x	x	x
MASB	Sigma				x		
Metanol	VWR	x		x		x	
Metobromurón	Dr Ehrenst.				x		
Metribuzina	Sigma			x			x
MTEOS	Sigma				x		
MWCNTs	Sigma					x	
NaAc · 3 H ₂ O	Merk						
NaCl	Sharlab						
Naftaleno	Dr Ehrenst.	x			x	x	x

Compuesto	Casa comercial ¹						
NH ₃	Sharlab		x	x			x
o-fenantrolina	Sigma			x			x
Ovoalbúmina	Sigma						
PAHs-Mix 18	Dr Ehrenst.	x			x	x	x
Piriproxifeno	Sigma						x
PEG	Sigma						
Propazina	Dr Ehrenst.					x	x
Sacarina	Guinama						
Sacarosa	Sigma						
SiO ₂ NPs (20 nm)	Sigma				x		
SWCNTs	Sigma					x	
TEOS	Sigma	x			x		
Terbutilazina	Dr Ehrenst.				x		x
TiO ₂ NPs (21 nm)	Sigma				x		
Tirosina	Sigma						
Tribenurón-metil	Sigma				x		x
Trifluralina	Dr Ehrenst.			x		x	x
Triflusulfurón-metil	Sigma						
VPBA	Sigma				x		
ZnO NPs (44 nm)	Sigma						x
ZrO ₂ NPs (20 nm)	Sigma						
γ-MAPS	Sigma						

3.2 INSTRUMENTACIÓN:

A lo largo del desarrollo de la tesis se han utilizado diferentes técnicas espectroscópicas, microscópicas y cromatográficas. A continuación, se describen detalladamente los correspondientes equipos.

3.2.1 Técnicas espectroscópicas:

3.2.1.1 Espectrofotometría UV-vis

Los espectros de absorción molecular UV-vis se obtuvieron empleando un espectrofotómetro Carry-60 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.) (Figura 12A). Las mediciones se realizaron con cubetas de cuarzo o plástico de 1 cm de paso óptico, registrando la señal entre 190 y 1000 nm. La adquisición y posterior tratamiento de datos se realizó con el software CarryWinUV (Agilent Technologies). También se realizaron medidas espectrofotométricas utilizando una fibra óptica (3.5 mm de diámetro y 10 mm de paso óptico) acoplada al espectrofotómetro Carry-60 (Figura 12B).

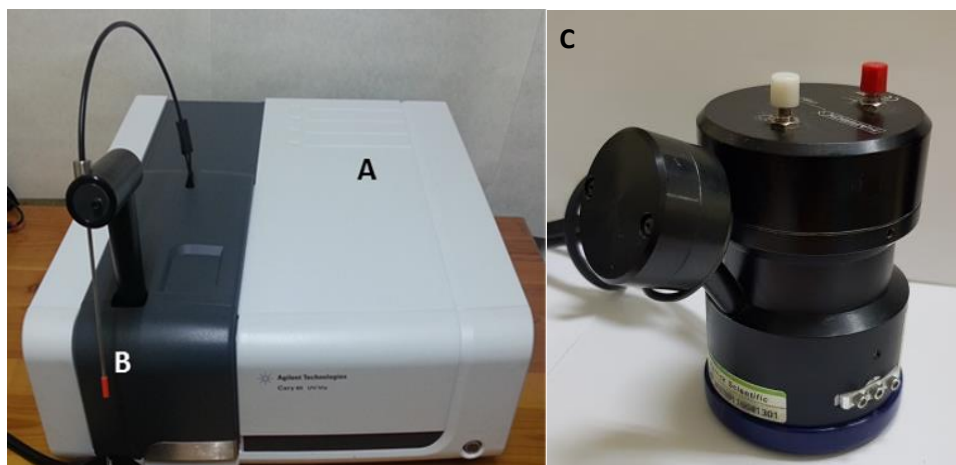


Figura 12. A) Espectrofotómetro UV-vis Carry-60; B) Fibra óptica; C) Sonda de reflexión difusa.

3.2.1.2 Espectrofotometría de reflectancia difusa

Para las medidas de reflectancia difusa se acopló al espectrofotómetro Carry-60 (Sección 3.2.1.1) una sonda remota de reflexión difusa (Harrick Scientific Products, New York, EE.UU.) equipada con una cámara de video y una luz integrada que facilita la selección del punto de la muestra a medir (Figura 12C). Las medidas se realizaron en el rango de 200 a 800 nm, y se empleó el software CarryWinUV para la adquisición y tratamiento de datos.

3.2.1.3 Espectroscopía infrarroja

La caracterización mediante espectroscopía infrarroja se realizó con un espectrofotómetro Cary 630 FTIR equipado con un accesorio de reflectancia total atenuada (ATR) (Agilent Technologies). Los espectros se registraron en el rango de frecuencias 4000-6000 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} . Se emplearon los softwares Microlab FTIR y ResolutionsPro (Agilent Technologies) para el registro y tratamiento de datos, respectivamente (Figura 13).



Figura 13. Espectrofotómetro Cary 630 FTIR-ATR.

3.2.1.3 Fluorescencia

Las medidas de fluorescencia se realizaron utilizando el espectrofluorímetro Cary Eclipse (Agilen Technologies) que se muestra en la Figura 14. Se emplearon una cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico para realizar las medidas. Para la optimización de la longitud de onda de excitación y emisión se obtuvo el espectro de excitación fijando la longitud de onda (λ) de emisión para una disolución de analito. A partir de este espectro se seleccionó la λ que proporcionaba mayor señal como λ de excitación, la cual se utilizó para obtener los espectros de emisión entre 300 y 500 nm.



Figura 14. *Espectrofluorímetro Cary Eclipse.*

3.2.2 Técnicas microscópicas

3.2.2.1 Microscopio óptico

Se empleó un microscopio ECLIPSE E200LED MV Series (Nikon, Tokio, Japón) bajo iluminación de campo claro y oscuro. El instrumento, equipado con 3 lentes objetivo de diferentes aumentos (10x, 50x y 100x), se muestra en la Figura 15. Para capturar las imágenes y su posterior procesado se utilizó el software Nis-Elements 4.20.02 (Nikon).



Figura 15. Microscópico óptico ECLIPSE E200LED MV.

3.2.2.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para la caracterización de la superficie de las fases desarrolladas a lo largo de la tesis se empleó un microscopio electrónico de barrido con cañón de emisión de campo con una resolución de 1.4 nm a 1 kV, Hitachi S-4800 (Tokio, Japón). La captación de imágenes y su procesamiento se realizó con el software QUANTAX 400 (Hitachi). Dada la baja conductividad de las fases a caracterizar, se llevó a cabo un sombreado previo con Au y Pd. El análisis se realizó a 20 kV (Figura 16).



Figura 16. Microscopio SEM Hitachi S-4800.

3.2.3 Técnicas cromatográficas

En los diferentes estudios realizados en esta tesis se han empleado sistemas de cromatografía líquida miniaturizada CapLC y NanoLC acoplados a un detector DAD. Ambos sistemas se han acoplado a IT-SPME con dos configuraciones diferentes, según el sistema utilizado para la carga de muestra (Sección 3.3). La adquisición de datos y su posterior tratamiento se ha realizado con el software HP ChemStation (Agilent Technologies). Por otro lado, se ha utilizado un equipo de CapLC con un detector de fluorescencia fabricado por Jasco (Tokio, Japón).

3.2.3.1 Cromatografía líquida capilar

El sistema de CapLC utilizado, Agilent 1200 Series (Agilent Technologies), estaba provisto de una bomba binaria convencional con divisor de flujo que permite trabajar con flujos inferiores a los $20 \mu\text{L min}^{-1}$. Para la introducción de la muestra se empleó una válvula manual de 6 puertos, Rheodyne 7721-i (IDEX Health and Science, Rohnert Park, CA, EE.UU.), en la que el bucle de inyección contenía la fase de extracción (Sección 3.3). La señal se registró entre 180 y 400 nm con un detector de fila de diodos (DAD) equipado con una celda de 80 nL (Agilent Technologies). El equipo con la configuración descrita se muestra en la Figura 17. Para la separación cromatográfica se emplearon columnas particuladas y monolíticas de Agilent y Phenomenex (Torrance, CA, EE.UU.) ambas con fase C18 (Sección 3.5.1).



Figura 17. Sistema de CapLC-DAD, Agilent 1200 Series con bomba binaria.

En la Figura 18 se muestra el equipo de CapLC con un detector de fluorescencia Jasco. Este equipo consiste en una bomba capilar isocrática Micro 21PU-01, una interfase LC-Net y un detector de fluorescencia Micro 21FP-01. Para la adquisición y el tratamiento de datos se empleó el software Jasco ChromNAV Chromatography Data System (Jasco).



Figura 18. Sistema de CapLC-FD, Jasco.

3.2.3.2 Nanocromatografía líquida

Para los estudios realizados en NanoLC se empleó una bomba binaria convencional con reductor de flujo, que permite obtener flujos inferiores a $4 \mu\text{L min}^{-1}$ (Agilent 1200 Series) (Figura 19). Se diseñaron diferentes configuraciones para la inyección de la muestra a fin de llevar a cabo el acoplamiento de la IT-SPME con el sistema nanocromatográfico (Sección 3.3). Se registraron las señales entre 190 y 400 nm empleando un detector DAD equipado con una celda de 80 nL. Para la separación cromatográfica se utilizaron dos columnas particuladas diferentes, según el modo de separación. Para la separación en fase reversa se empleó una columna C-18 ($50 \times 0.075 \text{ mm} \times 3.5 \mu\text{m}$) (Agilent Technologies) y para la separación cromatográfica en modo HILIC se hizo uso de una columna ZIC-HILIC® ($150 \times 0.075 \text{ mm} \times 5 \mu\text{m}$) (MERK, Darmstadt, Alemania).



Figura 19. Sistema de NanoLC-DAD, Agilent 1200 Series con bomba binaria.

3.3 TRATAMIENTO DE MUESTRA

En el marco de la presente tesis se ha utilizado como técnica de extracción la microextracción en fase sólida en tubo (IT-SPME) acoplada a diferentes sistemas de cromatografía líquida miniaturizados, así como microextracción en jeringa (MEPS). Se han diseñado dos configuraciones diferentes que permiten acoplar la IT-SPME a LC. Cabe destacar que para las muestras sólidas se aplicaron diferentes tratamientos previos antes de ser procesadas por IT-SPME. Seguidamente, se describen las configuraciones de IT-SPME utilizadas y los tratamientos empleados para el análisis de muestras sólidas por IT-SPME, así como el procedimiento experimental utilizado para preparar las jeringas para MEPS.

3.3.1 IT-SPME en válvula con 1 capilar

La IT-SPME en válvula con un capilar se utilizó fuera de línea y en línea tanto en CapLC como en NanoLC. El sistema de tratamiento de muestra utiliza una válvula de inyección manual de 6 puertos (Rheodyne) en la que el bucle de inyección convencional de acero es reemplazado por un capilar que contiene la fase de extracción (Figura 20). En los trabajos realizados se han empleado dos tipos de capilares de extracción. Por un lado se han utilizado columnas capilares de GC convencionales con la fase sorbente recubriendo las paredes del capilar. Adicionalmente se han utilizado fases de extracción sintetizadas en el laboratorio (ver sección 3.4). Se han empleado capilares con un d.i. de 320 μm para CapLC, y de 75 y 100 μm de d.i. para NanoLC.



Figura 20. Montaje de IT-SPME con 1 capilar.

Las muestras y las disoluciones patrón se inyectaron manualmente en el sistema cromatográfico con la válvula en la posición de carga, empleando una jeringa de precisión de vidrio. En algunos procedimientos se precisó de una etapa posterior de lavado, que consistió en hacer fluir un determinado volumen de agua nanopura después de introducir la muestra y sin cambiar la posición de la válvula. Con este proceso se eliminaron los compuestos de la matriz que no quedaban absorbidos en la fase de extracción. Finalmente, la válvula se giró a la posición de inyección, con lo cual la fase móvil atravesaba el capilar de extracción desorbiendo los analitos previamente retenidos y transfiriéndolos hasta la columna analítica.

El análisis de muestras sólidas de estruvita y suelo requirió un tratamiento de extracción previo a su procesado por IT-SPME.

Para el análisis de las muestras de estruvita se adicionaron a 0.7 g de las mismas 1.2 mL de una mezcla de metanol y acetato de etilo (1:1, v/v). Seguidamente la mezcla se centrifugó durante 5 min a 6000 rpm, se tomaron 800 μ L del sobrenadante y se evaporaron con la ayuda de una corriente de nitrógeno. Finalmente se reconstituyó el extracto con 600 μ L de agua nanopura y se procesó una alícuota de los extractos por IT-SPME-NanoLC-DAD.

Para el análisis de sulfonilureas en suelos se pesaron aproximadamente 1 g de suelo seco y tamizado ($\leq 2 \mu\text{m}$), se añadieron 4 mL de metanol y se introdujeron en un baño de ultrasonidos a 30 °C durante 30 min. Después se centrifugó durante 5 min a 5000 r.p.m. y se filtró el sobrenadante con un filtro de jeringa de 0.22 μm de tamaño de poro (Teknokroma, Barcelona, España). Finalmente, se evaporó el metanol con corriente de nitrógeno y se reconstituyó con 200 μ L de agua nanopura. Los extractos reconstituidos se procesaron por IT-SPME-CapLC-DAD.

Para la determinación de naftaleno y fluoranteno en suelos (Sección 4.1.2.2) se siguió un procedimiento similar al descrito anteriormente. En primer lugar se trató durante 30 min en baño de ultrasonidos a 30 °C, una mezcla de 0.3 g de suelo secado a temperatura ambiente y tamizado (<2 mm) y 1.3 mL de acetona utilizando viales de vidrio. Seguidamente, se centrifugó la mezcla a 5000 rpm durante 10 min y se filtró el sobrenadante empleando un filtro de nylon de 0.22 µm de tamaño de poro. El extracto filtrado se evaporó bajo corriente de nitrógeno, y se reconstituyó con 1 mL de agua nanopura. Finalmente, se procesaron 200 µL del extracto reconstituido por el sistema IT-SPME-CapLC-FD.

Por otro lado, para el análisis de ovoalbúmina en muestras de agua de lavado se llevó a cabo en primer lugar la hidrólisis de la proteína a fin de liberar los aminoácidos. Seguidamente se determinó la cantidad de triptófano y de tirosina generada mediante IT-SPME-NanoLC-DAD. Se seleccionaron estos dos aminoácidos ya que poseen un anillo aromático y por tanto mayor coeficiente de absortividad molar, es decir, por tratarse del conjunto de aminoácidos presentes en la ovoalbúmina, de los que mayor absorbancia poseen.

Para la hidrólisis de la ovoalbúmina se trató en un tubo pírex 1 mL de muestra con 10 µL de NaOH 5M y se calentó durante 8 horas a 95 °C. Una vez enfriada la mezcla a temperatura ambiente, se tomaron 400 µL y se mezclaron con 580 µL de acetonitrilo y 20 µL de ácido acético glacial. La mezcla resultante se homogenizó con la ayuda de un vórtex, y se procesaron 100 µL por IT-SPME-HILIC-NanoLC-DAD.

3.3.2 IT-SPME en válvula con 2 capilares

La configuración de IT-SPME con dos capilares, que se muestra en la Figura 21, se ha acoplado únicamente a NanoLC. Este sistema de inyección requiere de una válvula y una bomba adicionales al sistema descrito en el apartado anterior. Como se puede observar en la Figura 21, el sistema está compuesto por una bomba capilar (Shimadzu, Kioto, Japón) con la que se hacía circular una mezcla de H₂O:acetonitrilo (98:2 v/v). Esta bomba estaba conectada a una válvula manual de inyección de 6 puertos provista de un loop de PEEK de 500 µL de volumen interno (válvula 1). A su vez, esta válvula se encontraba conectada a una válvula automática de 10 puertos y dos posiciones (Valco, Huston, EE.UU.) en la cual se conectaron en serie dos capilares de extracción y el sistema de NanoLC.

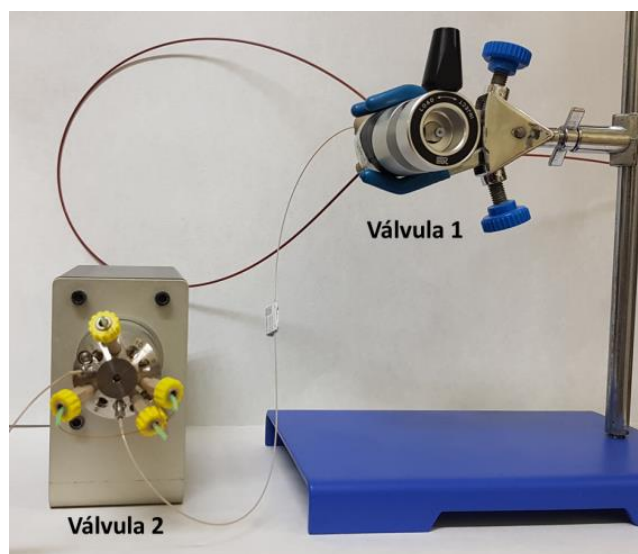


Figura 21. Sistema IT-SPME con dos capilares.

La Figura 21 muestra las diferentes etapas del sistema de inyección IT-SPME en válvula empleando dos capilares de extracción. En primer lugar, con las dos válvulas en posición de carga y mediante una jeringa de vidrio, se llenaba el loop PEEK con la muestra a procesar. Una vez cargada la muestra, se cambiaba la posición de la válvula 1 a la posición de inyección; de esta forma la fase móvil de la bomba capilar pasaba por el capilar PEEK transfiriendo la muestra hacia los capilares de extracción situados en la válvula 2, la cual se encontraba en posición de carga. Transcurrido un tiempo, denominado tiempo de transferencia (el cual se optimizó), la válvula 2 se cambiaba a la posición de inyección de manera que la fase móvil del sistema de NanoLC pasaba por los capilares de extracción desorbiendo los analitos retenidos y portándolos hacia la columna analítica.

3.3.3 MEPS

Para la preparación del dispositivo MEPS utilizado para la extracción de QACs, la parte superior de una aguja (1/2" Nr.2, 0.8 x 40 mm) se depositaron secuencialmente 2 mg de algodón, 10 mg de ceniza de café y otros 4 mg de algodón. En la Figura 22 se muestra la jeringa con el material sorbente. Para procesar la muestra, en primer lugar, se acondicionó el sorbente pasando 2 mL de agua. Una vez acondicionado, se procesaron 10 mL de muestra y se desorbieron los QACs retenidos con 300 μ L de metanol.



Figura 22. Fotografía de la jeringa con el material sorbente.

3.4 SÍNTESIS DE NUEVAS FASES PARA EXTRACCIÓN

Con el fin de mejorar la capacidad de extracción de las columnas comerciales de GC para IT-SPME, éstas se modificaron inmovilizando SWCNTs y MWCNTs sobre su superficie interna. Concretamente, se trataron columnas comerciales de GC de PDMS que contenían un 35 % y 5 % de grupos difenilo (TRB-35 y TRB-5, respectivamente).

Por otro lado, se sintetizó un nuevo recubrimiento polimérico de silicio sobre capilares de sílice fundida mediante un proceso sol-gel. Con el fin de mejorar la capacidad de extracción del polímero, la mezcla de monómeros utilizada para su síntesis se dopó con NPs de diferentes metales y óxidos metálicos, así como con NPs de SiO₂. También se llevó a cabo la síntesis de un monolito polimérico de base orgánica con grupos borato en su estructura. Seguidamente, se describen los procedimientos experimentales aplicados para la síntesis de las fases de extracción no comerciales empleadas en los diferentes estudios llevados a cabo en la presente tesis.

3.4.1 Inmovilización de nanotubos de carbono en columnas TRB-5 y TRB-35

La inmovilización de los CNTs se llevó a cabo utilizando el procedimiento descrito por Sombra, Moliner-Martínez, Cárdenas & Valcárcel, 2008. Previamente a su inmovilización en el capilar, los CNT fueron carboxilados (c-SWCNTs y c-MWCNTs).

Los c-SWCNTs fueron preparados siguiendo el procedimiento descrito por Suárez, Simonet, Cárdenas & Valcárcel, 2007. Para ello se añadieron 25 mg de SWCNTs a 3 mL de una mezcla de H_2SO_4 : H_2O (3:1), y se introdujeron en un baño de ultrasonidos durante 90 min (50 W, 60 Hz). Seguidamente, la mezcla se diluyó con 500 mL de agua y se filtró a través de un filtro de acetato de celulosa de 0.45 μm de tamaño de poro. Finalmente, el sólido obtenido (c-SWCNTs) se lavó con 1 mL de HCl 1 M y se secó a temperatura ambiente. Para la oxidación de los MWCNTs se siguió el procedimiento descrito por Sombra et al., 2007. Este procedimiento es similar al anterior a excepción de las cantidades iniciales, ya que en este caso se tomaron 20 mg de MWCNTs y se mezclaron con 80 mL de la disolución ácida.

Una vez oxidados los CNTs, se procedió a inmovilizarlos en la superficie de la columna capilar de PDMS. En primer lugar fue necesario activar la superficie del capilar de sílice pasando una disolución de NaOH 2 M que se dejó actuar durante 24 h. Después se pasó agua (5 min) seguida de una disolución de APTES al 2 % (v/v) preparada en acetona anhidra. Transcurridos 15 min, se eliminó el exceso de APTES pasando durante 5 min agua y luego metanol. Seguidamente, el capilar fue tratado durante 10 min con una disolución al 10 % (v/v) de glutaraldehído (que actúa como agente entrecruzante) disuelto en tampón borato 50 mM de pH 9. A continuación, se pasó por el capilar una dispersión de 5 mg mL^{-1} de c-CNTs y 0.5 mg de 1,3-diciclohexilcarbodiimida en 4.5 mL de DMF, y se esperó 30 min para que la reacción de anclaje tuviera lugar. Finalmente, el capilar se lavó con H_2O para eliminar el exceso de c-CNTs.

3.4.2 Columnas capilares recubiertas con un polímero de silicio

La síntesis de columnas capilares recubiertas por el material polimérico de silicio se basó en el procedimiento descrito por Silva et al., 2012. Esta síntesis se realizó en capilares vacíos de sílice fundida de 320 μm y 75 μm de d.i. para ser acoplados en CapLC y NanoLC, respectivamente.

En primer lugar fue necesario activar la pared del capilar. Para ello se pasó una disolución de NaOH 2M y se dejó actuar durante 2h a 40 °C. Seguidamente, se lavó el capilar con HCl 0.1 M, dejando actuar 30 min a temperatura ambiente y luego 3 h a 60 °C. A continuación, se lavó con agua y se hizo pasar una dispersión que contenía 65 mg de PEG, 50 µL de H₂O, 100 µL TEOS, 100 µL de TMOS y 2 mL de NH₄OH 0.1 M; se taparon los extremos y se dejó actuar durante 2h a 40°C y 12 h a 120 °C. Finalmente, el capilar se lavó con agua y acetonitrilo para eliminar el exceso de reactivos. Adicionalmente, a la mezcla de monómeros se añadieron nanopartículas de Ag, Au, Fe₂O₃, SiO₂, TiO₂, ZrO₂, CuO, ZnO o Al₂O₃ (0.05 mg mL⁻¹).

3.4.2 Columna capilar rellena con un monolito orgánico

Para la obtención de columnas capilares rellenas con un monolito orgánico, se siguió el procedimiento descrito a continuación.

En primer lugar fue necesario activar los capilares de sílice (100 µm de d.i.) recubriéndolos con γ-MAPS. Para ello se lavó el capilar con 100 µL de acetona y 100 µL de agua. A continuación, con la ayuda de una bomba de jeringa (KDScientific, Holliston, EE.UU.) se pasaron a través del capilar a un flujo de 250 µL min⁻¹, una disolución de NaOH 0.2 M y otra disolución de HCl 0.1 M (durante 30 min cada una). Seguidamente, el capilar se lavó por triplicado con 100 µL de etanol y se pasó durante 1 hora a 250 µL min⁻¹ una disolución de γ-MAPS al 20 % en etanol. Finalmente, se eliminaron los restos de reactivo con etanol y se pasó una corriente de nitrógeno durante 3 horas.

Una vez acondicionado el capilar, se sintetizó el monolito dentro del mismo. En primer lugar se disolvieron en una mezcla de metanol y acetonitrilo (1:1) los monómeros VPBA y divinilbenceno (DVB), y el iniciador radicalario AIBN. Después, la mezcla homogenizada se pasó manualmente a través del capilar, se sellaron los extremos con una goma y se introdujo el capilar en un baño de agua a 50 °C para que se iniciara la reacción de polimerización. Transcurrida una hora, se extrajo el capilar relleno con el polímero monolítico, y se lavó con etanol y acetonitrilo para eliminar los restos de reactivos.

3.5 PROCEDIMIENTOS Y CONDICIONES EXPERIMENTALES

3.5.1 Condiciones cromatográficas

En la Tabla 15, se muestran las condiciones experimentales utilizadas en los diferentes estudios y procedimientos desarrollados que emplean CapLC para la separación cromatográfica. Por otro lado, en la Tabla 16 se muestran las condiciones utilizadas en NanoLC-DAD. En todos los casos la fase móvil fue filtrada previamente a su utilización mediante filtros de nylon de 0.45 μm de tamaño de poro para CapLC y de 0.22 μm de tamaño de poro para NanoLC.

Tabla 15. Condiciones cromatográficas de los procedimientos utilizados en CapLC

Analito	Inyección	Fase extracción	Columna analítica	Fase móvil (ACN:H ₂ O)	Flujo (µL min ⁻¹)	Vol. muestra	Sección
Irgarol®-1051 Diurón	IT-SPME en válvula (1 capilar)	TRB-5	Zorbax® SB C18 35 mm x 0.5 mm 5 µm (Agilent Technologies)	70:30	20	4 mL	4.1.1.1
		TRB-20					
		TRB-25					
		TRB-50					
2-Hidroxi-terbutilazina Desetil-terbutilazina Atrazina Propazina Terbutilazina	IT-SPME en válvula (1 capilar)	TRB-5	Onyx monolithic C18 150 x 0.2 mm (Phenomenex)	30:70	5	4 mL + 100 µL	4.1.1.2
2-Hidroxi-terbutilazina Desetil-terbutilazina Atrazina Propazina Terbutilazina Piriproxfeno	IT-SPME en válvula (1 capilar)	TRB-5	Zorbax® SB C18 150 mm x 0.5 mm 5 µm (Agilent Technologies)	70:30 (0 min) 100:0 (8 min) 100:0 (18min) 70:30 (20 min)	10	4 mL + 50 µL	4.1.1.3
		TRB-35					
		c-SWCNTs-TRB-5					
		c-MWCNTs-TRB-5					
		c-SWCNTs-TRB-35					
		c-MWCNTs-TRB-35					

Tabla 15. continuación

Analito	Inyección	Fase extracción	Columna analítica	Fase móvil (ACN:H ₂ O)	Flujo (μL min ⁻¹)	Vol. muestra	Sección
Iodosulfurón-metil	IT-SPME en válvula (1 capilar)	TRB-5	Zorbax® SB C18 150 mm x 0.5 mm 5 μm (Agilent Technologies)	20:80 (0 min)	8	500 μL	4.1.2.1
Tritosulfurón		TRB-35		20:80 (10 min)			
Tribenurón-metil		Zb-WaxPlus		55:45 (15 min)			
Triflursulfurón-metil		ZB-FFAP TEOS-MTEOS-SiO ₂ TRB-50		70:30 (30 min)			
Metribuzina	IT-SPME en válvula (1 capilar)	TRB-5	Zorbax® SB C18 150 mm x 0.5 mm 5 μm (Agilent Technologies)	80:20	6	500 μL	4.1.2.1
Irgarol®-1051		TRB-35					
Bifenox		Zb-WaxPlus					
Cipermetrina		ZB-FFAP TEOS-MTEOS-SiO ₂ TRB-50					
Sacarina	IT-SPME en válvula (1 capilar)	TRB-35	Zorbax® SB C18 150 mm x 0.5 mm 5 μm (Agilent Technologies)	70:30 (0 min)	10	4 mL + 50 μL	4.1.2.2
Naftaleno		ZB-FFAP		100:0 (8 min)			
Fluoranteno		PS-DVB TEOS-MTEOS-SiO ₂ TEOS-MTEOS-TiO ₂		100:0 (18 min) 70:30 (20 min)			

Tabla 16. Condiciones cromatográficas de los procedimientos utilizados en NanoLC.

Analito	Inyección	Fase extracción	Columna analítica	Fase móvil (ACN:H ₂ O)	Flujo (µL min ⁻¹)	Vol. muestra	Sección
Desisopropil-atrazina		TRB-5					
2-Hidroxi-terbutilazina		TRB-35					
Desetil-terbutilazina	IT-SPME en	c-SWCNTs-TRB-5	Zorbax® 300 SB C18			500 µL	
Atrazina	válvula	c-MWCNTs-TRB-5	50 mm x 75 µm 3.5 µm	30:70	0.7	+	4.2.2.1
Propazina	(1 capilar)	TEOS-MTEOS	(Agilent Technologies)			10 µL	
Terbutilazina		TEOS-MTEOS-SiO ₂					
Irgarol®-1051							
M1 ¹							
Fluometurón							
Isoproturón							
Metobromurón							
Linurón	IT-SPME en	TEOS-MTEOS-SiO ₂	Zorbax® 300 SB C18	30:70 (0 min)			
Fenamifós	válvula	TEOS-MTEOS-TiO ₂	50 mm x 75 µm 3.5 µm	30:70 (2 min)		500 µL	4.2.2.2
Fenitrotión	(1 capilar)		(Agilent Technologies)	100:0 (8 min)	0.5		
Fentión				100:0 (13 min)			
Bifenox							
Iodosulfurón-metil		TEOS-MTEOS					
Tritosulfurón	IT-SPME en	TEOS-MTEOS-Au					
Tribenurón-metil	válvula	TEOS-MTEOS-Ag					
Metribuzina	(1 capilar)	TEOS-MTEOS-SiO ₂		20:80 (0 min)			
Desetil-terbutilazina	Y	TEOS-MTEOS-TiO ₂	Zorbax® 300 SB C18	70:30 (5 min)		500 µL	4.2.2.3
Triflusulfurón-metil	IT-SPME en	TEOS-MTEOS-ZrO ₂	50 mm x 75 µm 3.5 µm	70:30 (5 min)	0.5		
Terbutilazina	válvula	TEOS-MTEOS-CuO	(Agilent Technologies)	20:80 (17 min)			
Irgarol®-1051	(2 capilares)	TEOS-MTEOS-ZnO					
		TEOS-MTEOS-Al ₂ O ₃					
		TEOS-MTEOS-Fe ₂ O ₃					

1) M1: principal producto de degradación del irgarol®-1051

Tabla 16. Continuación.

Analito	Inyección	Fase extracción	Columna analítica	Fase móvil (ACN:H ₂ O)	Flujo ($\mu\text{L min}^{-1}$)	Vol. muestra	Sección
MASB Tribenurón-metil	IT-SPME en válvula (2 capilares)	TEOS-MTEOS-TiO ₂ TEOS-MTEOS-CuO	Zorbax® 300 SB C18 50 mm x 75 μm 3.5 μm (Agilent Technologies)	20:80 (0 min) 70:30 (5 min) 70:30 (5 min) 20:80 (17 min)	0.5	500 μL	4.2.2.4
Triptófano Tirosina	IT-SPME en válvula (1 capilar)	TEOS-MTEOS-CuO	ZIC-HILIC® 150 mm x 75 μm 5 μm (Merk)	95:5 (0 min) 95:5 (2.9 min) 80:20 (3 min) 80:20 (18 min) 95:5 (12.2 min)	0.5 - 0.7	500 μL	4.2.2.6
Iodosulfurón-metil Tritosulfurón Tribenurón-metil Metribuzina Desetil-terbutilazina Terbutilazina Irgarol®-1051 Fenitrotión Fentión Bifenox	IT-SPME en válvula (1 capilar)	VPBA-co-DVB	Zorbax® 300 SB C18 50 mm x 75 μm 3.5 μm (Agilent Technologies)	35:65	0.5	500 μL	4.2.2.7

3.5.2 Estudios de degradación

Los estudios de degradación del herbicida tribenurón-metil (TBM) se realizaron bajo dos condiciones diferentes. En la primera de ellas se fortificaron 25 mL de muestra de agua ambiental de diferente origen (agua de río, mar, transición y acequia) con $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de herbicida. Estas muestras se expusieron a la luz directa del sol bajo condiciones de laboratorio de temperatura ($22\text{-}30^\circ\text{C}$) y presión atmosférica, monitorizando y estudiando la variación de la concentración de tribenurón-metil y la aparición de los respectivos productos de degradación a lo largo de varias semanas.

Por otro lado, se estudió la velocidad de degradación del tribenurón-metil en muestras de agua irradiada con luz UV. Para ello se utilizó una unidad de reacción fotoquímica (Beam Bost ICT, Austria) equipada con una lámpara UV (8 W). Con la ayuda de una bomba peristáltica (Gilson®, Middleton EE.UU.) se hicieron circular las muestras a través de un tubo de polietileno de 0.8 mm de d.i., el cual estaba envolviendo a la lámpara UV (Figura 23). Una vez el tubo se encontraba lleno de la disolución de trabajo, se detenía la bomba peristáltica y se encendía la lámpara durante un determinado tiempo (tiempo de irradiación). Transcurrido este tiempo se apagaba la lámpara, activando nuevamente la bomba. La primera fracción de disolución emergente se desechaba, recogiendo a continuación una fracción de aproximadamente 1 mL en un vial de vidrio para su posterior análisis en el sistema IT-SPME-NanoLC.

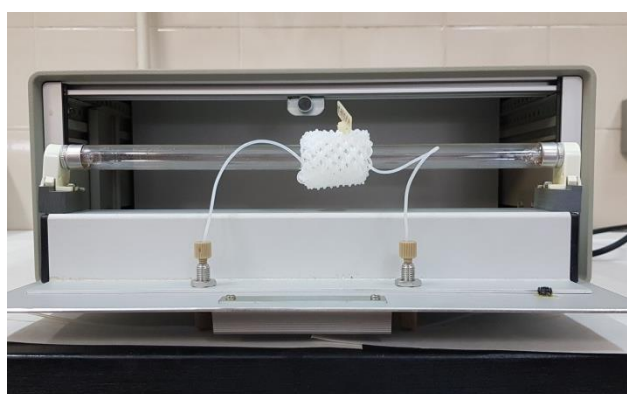


Figura 23. Reactor fotoquímico utilizado para el estudio de la degradación del tribenurón-metil.

3.5.3 Parámetros fisicoquímicos

Para el estudio de la degradación del tribenurón-metil en diferentes tipos de agua, se midieron diferentes parámetros fisicoquímicos para la caracterización de las mismas, los cuales se detallan a continuación.

pH y conductividad

Para la medida del pH y de la conductividad se empleó un equipo portátil Sension+MM150 DL (Loveland, CO, EE.UU.).

Turbidez

La turbidez de las diferentes matrices estudiadas se midió empleando un nefelómetro, concretamente, un turbidímetro laser HACH TU5200 (Loveland, CO, EE.UU.).

Demanda química de oxígeno

La demanda química de oxígeno (DQO) se determinó tratando 50 mL de muestra con 50 mL de agua nanopura, 400 μ L de disolución de NaOH al 40 % (m/v) y 10 mL de disolución de KMnO_4 0.002 M (previamente normalizado con un patrón primario oxalato de sodio). La mezcla se calentaba a ebullición durante 10 min. Seguidamente, se adicionaban 5 mL de H_2SO_4 (1:1) y 10 mL de disolución de oxalato de sodio 0.004 M. Finalmente, se determinaba el exceso de oxalato valorando con la disolución de KMnO_4 normalizada. Se trata, por tanto, de una valoración rédox autoindicadora, en la que el punto final se ponía de manifiesto cuando se observaba un exceso de valorante (color morado).

3.5.4 Determinación de compuestos de amonio cuaternario

La determinación de residuos de QACs por espectroscopía de absorción molecular se basó en la formación de un complejo coloreado entre el reactivo cromoazurol S (CAS) y el ion Al (III). La presencia de surfactantes origina la formación de un complejo ternario, produciendo un cambio en los espectros de absorción. Esta variación está relacionada con la cantidad de surfactante, y por tanto, puede determinarse la concentración del tensioactivo mediante medidas espectrofotométricas (Afkhami, et al., 2011). Se determinaron los compuestos de amonio cuaternario DDAC, DOAC y BAC por medida directa en cubeta, y utilizando papel y algodón como soporte. Además, las medidas utilizando algodón como soporte se aplicaron a la determinación de los QACs en superficies.

Por otro lado, con el fin de incrementar la sensibilidad del procedimiento de determinación de QACs en disolución se ha desarrollado un procedimiento de extracción basado en IT-SPME fuera de línea.

Los procedimientos utilizados para la determinación de QACs en disolución, sobre soporte sólido y empleando IT-SPME se describen a continuación:

En disolución

En primer lugar, se preparó la disolución de reactivo derivatizante (CAS-Al) en tampón acetato (0.01 M de pH 5.4) conteniendo 10^{-4} M de CAS y 1 mg mL^{-1} de Al(III). Para la determinación de los QACs se mezclaron en una cubeta de cuarzo 1 mL de la disolución derivatizante CAS-Al y 1 mL de la disolución patrón o de muestra. Finalmente se registró el espectro de absorción del complejo formado entre 400 y 800 nm.

Soporte papel y algodón

En los ensayos sobre papel se utilizaron tiras de papel de filtro (1 x 5 cm) Grade 41 Whatman 110 cm de diámetro (GE Healthcare Life Science, Pittsburgh, PA, EE.UU.). Los hisopos de algodón fueron adquiridos en supermercados locales; se determinó que estos hisopos contenían aproximadamente 25 mg de algodón en cada uno de sus extremos. Para realizar el ensayo, se sumergieron los dispositivos en 1 mL de muestra durante 5 min, y seguidamente otros 5 min en 1 mL de la disolución derivatizante de CAS-Al de la misma concentración que la utilizada para la reacción en disolución. Finalmente, se eliminó el exceso de derivatizante sumergiendo el dispositivo durante unos 2 min en 1 mL de agua nanopura. La determinación se llevó a cabo registrando el espectro de absorción entre 400 y 800 nm mediante reflectancia difusa. En caso de los hisopos, fue necesario retirar el algodón del soporte plástico con un cúter antes de realizar la medida.

Detección en superficies

La detección de QACs en superficie se realizó utilizando únicamente algodón como soporte. Para ello, en primer lugar, se sumergió el hisopo en un tampón 0.01 M de acetato de sodio de pH 5.4. Seguidamente, se frotaba el hisopo de algodón durante 15-20 s por aproximadamente 1-4 cm² de la superficie a analizar, tratando de moverlo en diferentes direcciones para asegurarse que todo el algodón quedaba impregnado del posible analito. Finalmente, se derivatizaba según se ha indicado anteriormente, midiendo a continuación la absorbancia. El procedimiento se aplicó a la detección de QACs sobre superficies de diferente material como acero, PVC y vidrio.

IT-SPME fuera de línea

Para la extracción y preconcentración de QACs mediante IT-SPME se empleó un montaje en-válvula equipado con una columna TRB-35 de 370 cm de longitud y 0.32 mm de d.i. Para la extracción, en primer lugar, fue necesario acondicionar el capilar haciendo fluir 1 mL de acetonitrilo, 1 mL de agua nanopura y 500 μ L de una disolución tampón de acetato de amonio 50 mM de pH 3.5. Seguidamente, se procesaron 10 mL de muestra, lavando el capilar con 200 μ L de acetonitrilo, y eluyendo los analitos retenidos con 600 μ L de este mismo disolvente. A continuación se evaporó a sequedad con una corriente de aire, puesto que el acetonitrilo dificulta la formación del complejo CAS-Al. Finalmente, se redisolvió el extracto en 100 μ L de agua y se añadieron 200 μ L de la disolución de reactivo derivatizante, midiendo la absorbancia de la disolución resultante entre 400 y 800 nm.

3.5.5 Cenizas

Para la obtención de las cenizas se digirió la muestra de alimento a fin de eliminar toda la materia orgánica. Para ello, se pesaron aproximadamente 10 g de alimento en una cápsula de porcelana y se sometieron a 550 °C en una mufla durante 12 h obteniendo las cenizas. Seguidamente, se añadieron lentamente 10 mL de HCl 6M y se calentó suavemente durante 30 min para hidrolizar los pirofosfatos y ortofosfatos y evitar así posibles interferencias. Una vez enfriado, se transfirió a un matraz aforado de 100 mL y se enrasó con agua. Las cenizas se utilizaron como material de extracción.

Para la determinación de hierro en las cenizas obtenidas, se introdujeron en un matraz aforado de 50 mL, 10 mL de la disolución de la muestra tratada, 1 mL de ácido ascórbico al 1 %, dos gotas de 2-nitrofenol y agua hasta un volumen total aproximado de 20 mL. A continuación, se añadió gota a gota una disolución de NaOH 2 M hasta que se observó el viraje del indicador a color amarillo. Entonces, se añadió HCl 1 M gota a gota hasta que la disolución se tornaba incolora; en este momento el pH de la disolución era ligeramente ácido. Seguidamente, se adicionaban 5 mL de tampón citrato al 2 % de pH 3.5 y 2 mL de o-fenantrolina al 0.25 %, enrasando con agua. Finalmente, transcurridos 15 min para asegurar que se había llegado al equilibrio, se midió la absorbancia a 510 y 700 nm. La longitud de onda más larga se utilizó para corrección de la señal.

3.6 MUESTRAS ANALIZADAS

En los trabajos que componen esta tesis se han analizado diferentes tipos de muestras, incluyendo muestras ambientales, aguas residuales, biota, estruvita recuperada o alimentos. La Tabla 17 resume los analitos estudiados y, en su caso su uso, para cada tipo de muestras analizadas. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado a temperatura ambiente.

Tabla 17. Tipo de muestras utilizadas y analitos/usos buscados en cada una.

Muestra	Analitos/usos
Agua de transición	Triazinas y productos de degradación, sulfonilureas, diurón, cipermetrina, bifeno, naftaleno y fluoranteno
Agua de mar	Triazinas y productos de degradación, sulfonilureas, diurón, cipermetrina y bifeno
Agua portuaria	Irgarol®-1051 y diurón
Agua de río	Sulfonilureas y triazinas
Agua de acequia	Sulfonilureas y triazinas
Aguas residuales	Compuestos de amonios cuaternario (DDAC, BAC, DOAC) y ovoalbúmina
Suelo	Sulfonilureas, irgarol®-1051, cipermetrina, bifeno, naftaleno y fluoranteno
Estruvita	Triazinas y productos de degradación
Espinacas	Clorofila a
Alimentos	Hierro/cenizas como adsorbente

3.6.1 Aguas

Según la Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, del 12 de agosto de 2013, las aguas pueden clasificarse en continentales y costeras. Por aguas continentales se entienden todas las aguas superficiales o subterráneas, situadas hacia tierra desde la línea que sirve de base para medir la anchura de las aguas territoriales. Estas pueden clasificarse en aguas subterráneas o superficiales (ríos, lagos, de transición...). Por otro lado, las aguas que se extienden entre esta línea y una milla náutica mar a dentro son las denominadas aguas costeras. Además de los tipos de aguas ya mencionados existen las aguas residuales, que se pueden definir como cualquier tipo de agua cuya calidad se ha visto perjudicada por actividades antropogénicas.

Aguas superficiales

Para el desarrollo de la presente tesis se han analizado aguas superficiales de diferente naturaleza, todas ellas tomadas en diferentes puntos de la Comunitat Valenciana. Las aguas correspondientes a las zonas de transición se tomaron en tres de las zonas de transición más importantes de esta región, Salinas de Santa Pola, Estany de Cullera y Río Xúquer. Respecto a las aguas costeras, éstas fueron tomadas en diferentes puntos de la costa valenciana. Las aguas de puerto se tomaron en el puerto de València y los puertos deportivos de Port Saplaya y Canet d'En Berenguer. Las muestras de río corresponden al Río Ullal a su paso por Massalavés, y el agua de acequia fue tomada del sistema de riego de la ciudad de València.

Todas las muestras fueron recogidas en botellas de vidrio topacio (250 mL), que se llenaron completamente y mantuvieron a 4 °C hasta su análisis. Antes de su análisis las muestras se filtraron o centrifugaron.

En este tipo de aguas se han analizado diferentes pesticidas y sus productos de degradación, como por ejemplo triazinas y sulfonilureas. En la Tabla 17 se muestran los compuestos analizados en cada tipo de agua.

Aguas residuales

Las aguas residuales analizadas se obtuvieron en diferentes etapas de procesos de limpieza aplicados en la industria alimentaria. En concreto se emplearon aguas residuales procedentes de una industria láctea para evaluar la presencia de restos de detergentes mediante la determinación de QACs, y de una fábrica productora de ovoproductos para el estudio y determinación de ovoalbúmina.

3.6.2 Suelos

Los suelos agrícolas son los receptores directos de cantidades ingentes de pesticidas utilizados en agricultura intensiva, ya que solo una fracción de la cantidad aplicada incide (y permanece) directamente sobre la vegetación. Una vez en contacto con el suelo, la distribución y/o disipación de este tipo de compuestos es función de numerosos factores tales como las características fisicoquímicas del pesticida (solubilidad en agua, estabilidad frente a la temperatura o a la radiación solar), y del propio suelo (acidez, humedad, riqueza en microorganismos), condiciones meteorológicas... Muchos de los procesos implicados son sinérgicos, y a día de hoy no se conocen completamente. En cualquier caso, el análisis de pesticidas en suelos es de gran interés debido al riesgo potencial que representan tanto ellos como sus productos de degradación para los ecosistemas, en particular para el medio acuático. Las muestras de suelo analizadas se tomaron de una zona agrícola de la Comunitat Valenciana. Las muestras se secaron en primer lugar a temperatura ambiente y se tamizaron ($\leq 2 \mu\text{m}$) antes del análisis.

3.6.3 Estruvita

La estruvita es un mineral de la clase de los fosfatos ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) que se origina principalmente por la descomposición bacteriana de la materia orgánica. Se trata de un compuesto de gran interés como fertilizante, puesto que contiene un alto contenido de fosfato y magnesio, y su baja solubilidad en agua lo sitúa como un fertilizante de lenta liberación. La precipitación de este mineral en los procesos de tratamiento de materia orgánica, como los llevados a cabo en las plantas de tratamiento de agua residual, suponen una práctica sostenible para la recuperación de fosfato y amonio como fertilizante (Lee, Kumar & Jeon, 2016).

Se estudió la presencia de diferentes contaminantes ambientales en muestras de estruvita con el fin de comprobar que la reutilización del mineral no suponía la liberación de compuestos contaminantes al medio. Concretamente, se analizaron muestras de estruvita recuperada de la planta de tratamiento de agua residual.

3.6.4 Biota

En este estudio se utilizaron hojas de espinacas lavadas y empaquetadas destinadas al consumo humano, obtenidas en un supermercado local. Por otro lado, se utilizaron plantas de espinacas para monitorizar el contenido de clorofila a como marcador de estrés en plantas; para ello se sometieron diferentes plantas a la acción de pesticidas, estudiando el daño provocado a través de la estimación de clorofila a.

3.6.5 Alimentos

En este estudio se obtuvieron cenizas y analizó el contenido de hierro en muestras de copos de maíz, granos de café natural tostado, cacao en polvo y paté con un contenido de hígado de cerdo del 22.5 %, todas ellas adquiridas en supermercados locales. Las cenizas obtenidas para las muestras de café se utilizaron como fase extractante.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 IT-SPME ACOPLADA EN LÍNEA A CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CAPILAR

La IT-SPME se ha acoplado a CapLC empleando como fases de extracción columnas capilares recubiertas con materiales sorbentes de diferente naturaleza. En todos los estudios de IT-SPME-CapLC realizados se ha empleado como fase de extracción un capilar de sílice fundida de 0.32 mm de d.i. pero diferente longitud (30-100 cm), cuyas paredes internas estaban recubiertas con el material sorbente. Para el acoplamiento de IT-SPME y CapLC, se ha empleado un montaje tipo IT-SPME en válvula. Como se ha comentado anteriormente, este montaje consiste en sustituir el loop de inyección de una válvula de 6 vías por el capilar que contiene la fase de extracción. De esta manera, al procesar un gran volumen de muestra respecto al volumen interno del capilar, los analitos quedan retenidos en la fase de extracción; posteriormente al cambiar la válvula a la posición de inyección son desorbidos por la fase móvil consiguiendo su preconcentración (para más detalles ver Sección 3.3.1)

Las fases de extracción utilizadas en IT-SPME-CapLC se pueden dividir en dos grupos. Por un lado, se han utilizado columnas comerciales de GC sin modificar y modificadas con c-CNTs. Por otro lado, se han sintetizado nuevos materiales sorbentes con el fin de incrementar la selectividad y la capacidad de extracción; concretamente se han recubierto las paredes de capilares de sílice con un material polimérico de TEOS-MTEOS que se ha dopado con NPs de SiO₂ y TiO₂.

A continuación se muestran y discuten los resultados obtenidos en los estudios realizados sobre la capacidad de extracción y preconcentración de las fases mencionadas anteriormente, utilizando diferentes contaminantes ambientales.

4.1.1 Fases comerciales y modificadas

4.1.1.1 Determinación de biocidas en agua por IT-SPME-CapLC-DAD. Estimación de la huella de carbono

En este primer apartado se describen y discuten los resultados obtenidos en el desarrollo de un procedimiento de IT-SPME-CapLC para la determinación de diurón e irgarol®-1051 en muestras de agua empleando columnas comerciales de GC para la extracción.

Optimización del procedimiento de IT-SPME

En primer lugar se ha optimizado la etapa de extracción en línea. Para ello se ha estudiado la influencia de la naturaleza de la fase de extracción, de la longitud de la columna capilar y del volumen de muestra procesado.

Como fase de extracción se han empleado columnas capilares de GC comerciales recubiertas de PDMS con diferente porcentaje de grupos difenilo (5, 20, 35 y 50 %). La Figura 24A muestra el área de pico obtenida al procesar 1 mL de una disolución patrón de irgarol®-1051 ($2.5 \mu\text{g L}^{-1}$) y de diurón ($25 \mu\text{g L}^{-1}$) empleando para la extracción segmentos de 30 cm de cada una de las columnas seleccionadas. Como se puede observar, se produce un aumento de la señal analítica al aumentar la cantidad de grupos difenilo que contiene la fase de extracción hasta el 35 %. Sin embargo, se produce una disminución notable del área de pico al utilizar un 50 % de grupos difenilo. Este cambio en la tendencia puede ser debido a un incremento significativo de la polaridad de la fase absorbente que provoca una disminución de la interacción con los analitos, y por tanto que la cantidad retenida de éstos sea menor. Se seleccionó el capilar recubierto con PDMS y un 35 % de grupos difenilo (TRB-35) como la fase de extracción óptima.

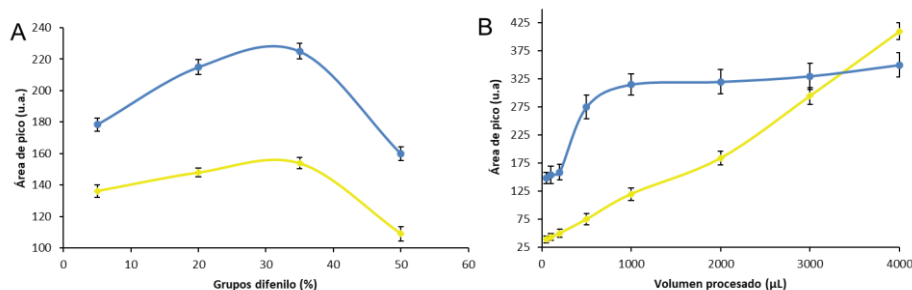


Figura 24. Influencia en el área de pico de: A) el porcentaje de grupos difenilo en la fase TRB; B) el volumen de muestra procesado para una disolución patrón de $2.5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Irgarol®-1051 (amarillo) y $25 \mu\text{g L}^{-1}$ de diurón (azul).

La siguiente variable optimizada fue la longitud de la columna capilar de extracción. Para ello, se procesó 1 mL de una disolución mezcla de irgarol®-1051 ($2.5 \mu\text{g L}^{-1}$) y diurón ($25 \mu\text{g L}^{-1}$) por diferentes columnas TRB-35 de 30, 60 y 100 cm de longitud. Como era de esperar, al aumentar la longitud de la columna de extracción aumentaba la señal analítica. La respuesta del Irgarol®-1051 se incrementó un 18 % y un 57 % al utilizar las columnas de 60 y 100 cm, respectivamente, comparadas con la respuesta obtenida al utilizar la columna de 30 cm. Para el diurón el área de pico se incrementó un 36 % y un 75 % empleando columnas de 60 y 100 cm de longitud, respectivamente. Se seleccionó 100 cm como longitud óptima del capilar de extracción; cabe mencionar que cuando se utilizaron columnas con longitudes mayores de 100 cm no se observó un aumento significativo del área de pico respecto a la obtenida con la columna de 100 cm.

Finalmente se optimizó el volumen de muestra. Para ello, se procesaron volúmenes crecientes de 50 µL a 4 mL de disolución patrón de irgarol®-1051 y diurón de las concentraciones ya indicadas. Las señales analíticas obtenidas se muestran en la Figura 24B. Como se puede observar en dicha figura, se obtuvo mayor respuesta analítica a medida que aumenta el volumen de muestra procesado. En el caso del diurón, este aumento fue poco significativo al procesar volúmenes entre 0.5 y 4 mL. Esto puede ser debido a la autoelución del analito a medida que se carga la muestra (Campíns-Falcó et al., 2010). Se seleccionó 4 mL como el volumen de muestra óptimo puesto que se obtuvo mayor área de pico, y por tanto, mayor sensibilidad, teniendo en cuenta además que en el análisis de agua de mar el volumen de muestra no era una limitación.

A pesar de que la IT-SPME es una técnica de microextracción no exhaustiva y por tanto no se pueden conseguir extracciones cuantitativas, sí se pueden alcanzar elevados factores de respuesta dado el volumen de muestra que se puede procesar. La eficiencia de la extracción para el irgarol®-1051 y para el diurón se estimó comparando la cantidad de analito extraído (cantidad de analito transferido desde la columna de extracción a la columna analítica) y la cantidad de analito que se procesa por la columna capilar de extracción TRB-35. La cantidad de analito extraído se estableció a partir de las áreas de pico y las rectas de calibrado obtenidas al inyectar directamente 2 μL de disolución patrón. Se consiguieron eficiencias de extracción del 3 % y el 19 % para el diurón y el irgarol®-1051, respectivamente; estos valores son acordes con la técnica empleada (Campíns-Falcó et al., 2010). La Figura 25 muestra el cromatograma obtenido para una mezcla de diurón e irgarol®-1051 en las condiciones óptimas de trabajo. Los tiempos de retención y los espectros UV-vis correspondientes a cada pico se usaron para confirmar la presencia de ambos biocidas en las muestras de agua analizadas. En las muestras positivas se cuantificó la concentración de analito empleando el área de pico como señal analítica.

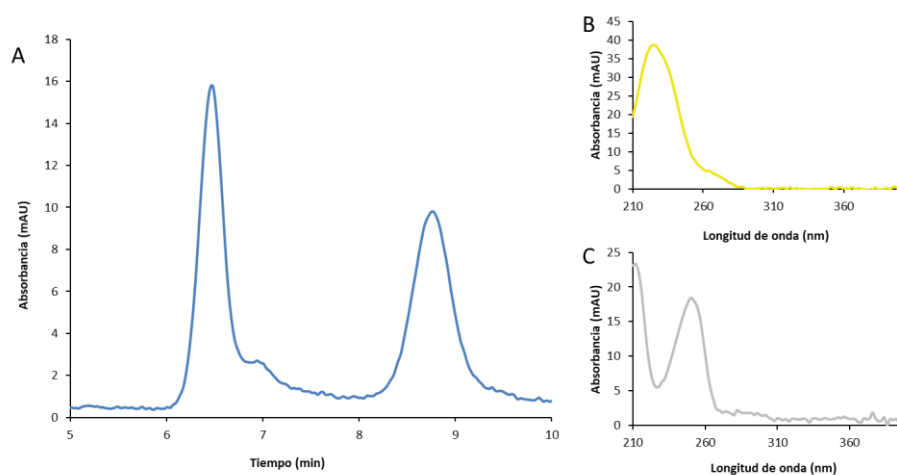


Figura 25. A) Cromatograma obtenido a 230 nm para una mezcla de irgarol®-1051 ($2.5 \mu\text{g L}^{-1}$) y diurón ($125 \mu\text{g L}^{-1}$); B) espectro UV del pico correspondiente al diurón; C) espectro del pico del irgarol®-1051.

Parámetros analíticos

La Tabla 18 muestra las rectas de calibrado, la precisión y los límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs) para el irgarol®-1051 y el diurón medidos a 226 nm y 254 nm, respectivamente. El LOD se estimó experimentalmente a partir de las disoluciones patrón como la concentración de analito que resultó en una relación señal/ruido de 3, mientras que el LOQ se estableció considerando una relación señal/ruido de 10. La precisión del método se ha expresado como la desviación estándar relativa (RSD, %).

Como se puede observar en la Tabla 18, se obtuvieron parámetros analíticos satisfactorios. El intervalo de linealidad fue de 0.02 - 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ para el Irgarol®-1051, y 0.7 – 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ para el diurón. El LOD obtenido fue 0.2 y 0.015 $\mu\text{g L}^{-1}$ para el diurón y el irgarol®-1051, respectivamente. Estos resultados muestran que la sensibilidad del método propuesto es adecuada para la determinación de ambos biocidas en muestras de agua, ya que los LODs son inferiores a los niveles máximos fijados por la legislación europea para este tipo de sustancias (Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, del 12 de agosto de 2013).

Por otro lado, se evaluó la precisión del método propuesto, expresada como RSD. La RSD obtenida fue inferior al 4 %, lo cual indica que el método presenta una precisión satisfactoria (Tabla 18). Además, se estimó la precisión de los tiempos de retención obteniéndose un valor de RSD de 0.3 % para el irgarol®-1051 y de 0.5 % para el diurón.

Tabla 18. Parámetros analíticos obtenidos para la determinación de irgarol®-1051 y diurón.

Analito	Intervalo lineal ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recta de calibrado ($y = a + bx$)			LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD (%) (n=3)
		$a \pm s_a$	$b \pm s_b$	R^2		
Irgarol®-1051	0.02 – 10	7 ± 70	188 ± 14	0.995	0.015	3.2
Diurón	0.7 - 15	6 ± 4	11 ± 1	0.998	0.200	1.5

En la Tabla 19 se muestran algunos detalles experimentales y parámetros analíticos de diferentes procedimientos descritos en la bibliografía para la determinación de diurón e irgarol®-1051 en muestras de agua. Como puede observarse, la precisión (RSD) para el procedimiento de IT-SPME-CapLC-DAD es mucho mejor que la obtenida por otras metodologías, probablemente debido a la eliminación de las etapas del tratamiento de muestra fuera de línea. Como era de esperar, la sensibilidad del procedimiento propuesto es menor que la obtenida con extracción sobre barra agitadora (SBSE) y GC-MS o con procedimientos basados en SPE en línea con un detector de espectrometría de masas. No obstante, la sensibilidad es adecuada para el análisis de aguas ambientales según la legislación europea. Por otro lado, el tiempo de análisis de estos procedimientos es superior a los 20 min, mientras que el procedimiento descrito permite realizar el análisis en tan solo 10 min.

Tabla 19. Procedimientos descritos en bibliografía para la determinación en muestras de agua de irgarol®-1051 y diurón.

Tratamiento de muestra		Volumen de muestra (mL)	Separación / detección	Tiempo de análisis (min)	Parámetros analíticos		Huella de carbono (Kg CO ₂)	Referencia
Fuera de línea	En línea				LOD (ng L ⁻¹)	RSD (%)		
SPE	-	100	LC-DAD	17	7 – 415	<11	1.80	Sánchez-Rodríguez et al. (2011)
SPE	-	500	LC-DAD	60	5 – 11	<14	2.30	Gatidou et al. (2005)
SBSE	-	10	TD-GC-MS	110	5 – 900	<30	16.90	Giraldez et al. (2013)
HS-PMME	-	15	GC-MS	80	10 - 30	<9	220.00	Lambropoulou et al. (2002)
MF-SPME	-	300	LC-DAD	100	1.4 – 4.8	<12	23.80	Saleh et al. (2014)
-	SPE	100	LC-APCI-MS	25	5 - 10	5-10	19.60	Ferrer & Barceló (1999)
-	SPE	100	LC-APCI-MS	21	5 - 200	<8	17.80	Gimeno et al. (2001)
-	SPE	20	LC-ESI-MS/MS	26	3 - 10	<32	41.10	Singer et al. (2010)
-	IT-SPME	4	CapLC-DAD	10	15 -200	<4	1.10	Procedimiento propuesto

Estimación de la huella de carbono

Como se ha mencionado anteriormente, desde un punto de vista cualitativo la metodología IT-SPME-CapLC-DAD es una técnica respetuosa con el medio ambiente ya que se reduce la cantidad de disolventes orgánicos y reactivos tóxicos utilizados. Sin embargo, la falta de indicadores ambientales cuantitativos dificulta la estimación de su impacto ambiental y la comparación entre metodologías. Se propuso evaluar el impacto ambiental de un procedimiento analítico a través del cálculo de la estimación de la huella de carbono (CFP). En este caso se ha empleado la CFP como indicador ambiental para evaluar cuantitativamente el impacto ambiental del procedimiento propuesto y poder compararlo con el resto de metodologías descritas en la literatura con la misma finalidad (métodos descritos en la Tabla 19).

La CFP se define como la cantidad de gases de efecto invernadero expresada como Kg de CO₂. En la Tabla 19 se muestra el valor de la CFP de las metodologías descritas en la bibliografía para la determinación de ambos biocidas. Como puede observarse, el valor de la CFP depende significativamente del tratamiento de muestra y de la técnica de separación/detección utilizada. De los procedimientos comparados en la Tabla 19, el procedimiento basado en IT-SPME-CapLC-DAD es el que menor huella de carbono tiene (1.10 KgCO₂ eq). Los dos procedimientos de SPE-LC-DAD descritos en la Tabla 19 generan 1.80 y 2.30 Kg de CO₂ por análisis, siendo más perjudiciales para el medio ambiente. Esto es debido a que estos procedimientos consumen más energía eléctrica ya que la SPE incluye una etapa de evaporación para conseguir una mayor preconcentración. Además, los tiempos de análisis son más elevados, y durante la etapa de tratamiento de muestra se utiliza gran cantidad de disolventes orgánicos generándose una mayor cantidad de residuos (200-300 mL/100 mL de muestra).

Además, los procedimientos en línea incluidos en la Tabla 19 también presentan una mayor huella de carbono que el procedimiento de IT-SPME propuesto. Esto se debe a que estos procedimientos utilizan un espectrómetro de masas como detector. Los procedimientos de microextracción en fase sólida en espacio de cabeza (HS-SPME) y SBSE acoplados a GC-MS son los que mayor cantidad de emisiones generan, especialmente el segundo ya que requiere para el acondicionamiento de la muestra un baño de agua y agitación.

Por todo ello se puede concluir que de todos los procedimientos comparados, el método IT-SPME-CapLC-DAD es el más satisfactorio, no solo porque la sensibilidad y la precisión son adecuadas sino también porque se reduce el impacto ambiental del análisis.

Análisis de muestras de agua

El procedimiento IT-SPME-CapLC-DAD propuesto fue utilizado para el análisis de muestras de agua de tres puertos de la Comunitat Valenciana recogidas en diferentes épocas del año. La Tabla 20 recoge las muestras analizadas y los resultados obtenidos mediante el procedimiento propuesto.

Tabla 20. Resultados obtenidos en el análisis de las muestras y estudios de recuperación utilizando IT-SPME-CapLC-DAD.

Muestra			Concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Recuperación (%) (n=5)	
			Irgarol®-1051	Diurón	Irgarol®-1051	Diurón
Puerto de València	1	Marzo	< LOQ	< LOD	102 \pm 9	96 \pm 4
	2	Abril	< LOQ	< LOD	110 \pm 5	100 \pm 5
	3	Junio	< LOD	< LOD	104 \pm 6	105 \pm 6
	4	Julio	< LOD	< LOD	102 \pm 4	99 \pm 7
Puerto Port Saplaya	5	Marzo	< LOD	< LOD	92 \pm 5	99 \pm 4
	6	Abril	< LOD	< LOD	108 \pm 3	103 \pm 6
	7	Junio	< LOD	< LOD	113 \pm 3	96 \pm 5
	8	Julio	< LOD	< LOD	115 \pm 6	100 \pm 8
Puerto Canet de Siles	9	Marzo	< LOD	< LOD	93 \pm 5	92 \pm 7
	10	Abril	< LOD	< LOD	98 \pm 4	105 \pm 6
	11	Junio	< LOD	< LOD	91 \pm 8	94 \pm 8
	12	Julio	< LOD	< LOD	103 \pm 5	98 \pm 6

Tal y como puede observarse en la Tabla 20, la concentración de diurón en todas las muestras de agua fue inferior al LOD, cumpliendo así con los estándares marcados por la legislación europea. Respecto a la concentración de irgarol®-1051, está también fue inferior para todas las muestras excepto las muestras 1 y 2 del Puerto de València, donde se observó su presencia, pero con una concentración inferior al LOQ. A modo de ejemplo, en la Figura 26 se muestra el cromatograma obtenido para la muestra 1 del puerto de València. La presencia de irgarol®-1051 se puede explicar si se tiene en cuenta que se trata de uno de los puertos más importantes de España y acoge un gran volumen de tráfico marítimo.

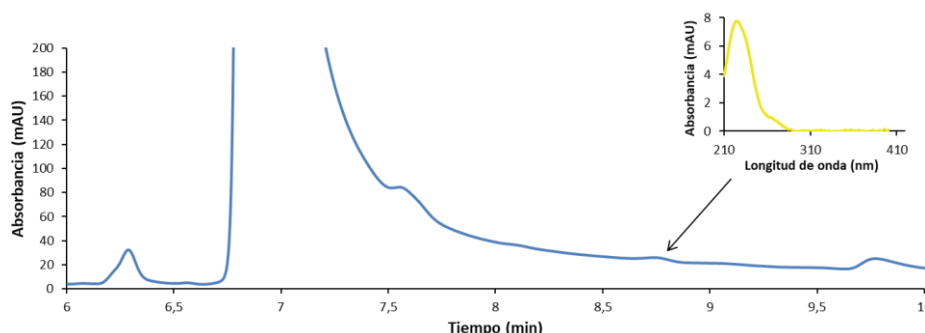


Figura 26. Cromatograma obtenido a 230 nm para la muestra 1. Espectro UV del pico a 8.7 min, correspondiente al irgarol®-1051.

Por último, con el fin de validar la exactitud de los resultados obtenidos dado que no existen materiales de referencia para los analitos en la matriz de interés, se realizaron estudios de recuperación como alternativa para su evaluación. Para ello, se fortificaron las muestras con $0.2 \mu\text{g L}^{-1}$ de irgarol®-1051 y $1.5 \mu\text{g L}^{-1}$ de diurón analizándose posteriormente por el método propuesto. Los valores de recuperación (Tabla 20) obtenidos para todas las muestras se encuentran entre 91 % y 113 %, siendo las recuperaciones aceptables para el análisis ambiental. Por tanto, se puede asumir que el procedimiento propuesto no está afectado por el efecto matriz.

Conclusiones

En el presente trabajo se propone un método alternativo a los procedimientos descritos en la literatura para la determinación de diurón e Irgarol®-1051 en muestras de agua, basado en el acoplamiento de la IT-SPME con CapLC y un detector DAD. El procedimiento propuesto se ha aplicado satisfactoriamente a la determinación de ambos biocidas en muestras de agua. Los LODs obtenidos son $0.015 \mu\text{g L}^{-1}$ para el Irgarol®-1051 y $0.2 \mu\text{g L}^{-1}$ para el diurón; por tanto, el método se puede utilizar para la evaluación de la calidad del agua según los estándares marcados por la legislación europea. Cabe señalar que la precisión obtenida también ha sido satisfactoria.

Además, se ha evaluado el impacto ambiental del procedimiento IT-SPME-CapLC-DAD propuesto mediante el cálculo estimado de la CFP. Se ha comparado la CFP del procedimiento propuesto con la de otros procedimientos descritos en bibliografía para la identificación y determinación de ambos biocidas, siendo el método propuesto el más respetuoso con el medio ambiente. Los resultados muestran que el método propuesto es una alternativa al resto de procedimientos, ya que posee sensibilidad suficiente según lo exigido por la legislación europea para evaluar la calidad del agua, y el impacto ambiental del análisis es mucho menor que el de los otros procedimientos.

Finalmente, la metodología propuesta ha sido aplicada al análisis de muestras de agua de diferentes puertos de la Comunitat Valenciana. Los resultados muestran que la concentración de Irgarol®-1051 y diurón en la mayoría de las muestras era inferior al LOD, cumpliendo con los estándares de calidad europeos.

4.1.1.2 Análisis de triazinas y sus productos de degradación en agua por IT-SPME-CapLC-DAD

En este apartado se propone un procedimiento de IT-SPME acoplado a CapLC-DAD para la determinación de diferentes triazinas y algunos de sus respectivos productos de degradación en muestras de agua. Para la extracción mediante IT-SPME se utilizó una columna comercial de GC TRB-5, evaluando la posibilidad de incrementar la capacidad de extracción al modificar dicha fase con c-CNTs, tanto de pared simple como múltiple.

Optimización de las condiciones de separación

Previamente a la optimización de las condiciones de separación fue necesario definir las dimensiones del sistema IT-SPME, es decir, la longitud del capilar de extracción. En un principio, cabe pensar que al aumentar la longitud del capilar y por tanto la cantidad de fase, se obtendría una mayor respuesta analítica (mayor sensibilidad). Sin embargo no siempre es así. Según el flujo de trabajo y la composición de la fase móvil, no es recomendable el uso de capilares de gran longitud puesto que aumentan los tiempos de desorción y transferencia a la columna analítica de los analitos, produciéndose un ensanchamiento de los picos.

Basándonos en trabajos previos (Moliner-Martínez et al., 2011), se decidió utilizar un capilar de 40 cm de longitud y trabajar con un flujo de fase móvil de 5 $\mu\text{L min}^{-1}$. En estas condiciones, los analitos retenidos tardaron aproximadamente 8 min en recorrer el sistema IT-SPME y llegar a la columna analítica. El tiempo extra introducido por el sistema IT-SPME no afectaba significativamente ni a la forma de los picos cromatográficos ni al tiempo de análisis.

Inicialmente se ensayaron diferentes condiciones de elución con el fin de optimizar la composición de la fase móvil y conseguir así la desorción rápida y cuantitativa de los analitos de la fase de extracción y su posterior transferencia a la columna analítica, así como una adecuada separación cromatográfica de los analitos en la columna analítica. Las fases móviles ensayadas fueron distintas mezclas de agua y acetonitrilo, con un contenido de disolvente orgánico variable entre el 20 % y el 95 % (v/v).

Como se ha señalado anteriormente, con el fin de conseguir elevados factores de preconcentración es necesario procesar volúmenes de muestra relativamente altos respecto el volumen interno del capilar de extracción. En este caso se procesaron 4 mL de muestra por un capilar de extracción de aproximadamente 32 μ L de volumen interno. Sin embargo, cuando se procesan grandes volúmenes de muestra, además de los analitos pueden quedar retenidos en la fase de extracción otros compuestos presentes en la muestra que darán lugar a los correspondientes picos en el cromatograma. La presencia de estos picos ocasiona cromatogramas con un elevado fondo, incluso cuando se procesa agua nanopura. Según Campíns-Falcó et al. (2010) los picos de fondo obtenidos pueden deberse a la presencia de compuestos del agua ubicuos tales como ftalatos, ácidos carboxílicos y derivados fenólicos; en el caso estudiado ninguno de los picos interfería ya que eluían a diferentes tiempos que los correspondientes a los analitos en el cromatograma.

Para reducir posibles interferencias asociadas a la matriz de la muestra, se decidió pasar por el capilar 100 μ L de agua nanopura después de procesar la muestra. De esta manera se elimina parte de la matriz de la muestra que pueda quedar en el capilar. Se comprobó que empleando 100 μ L de agua nanopura no se eluían los analitos retenidos.

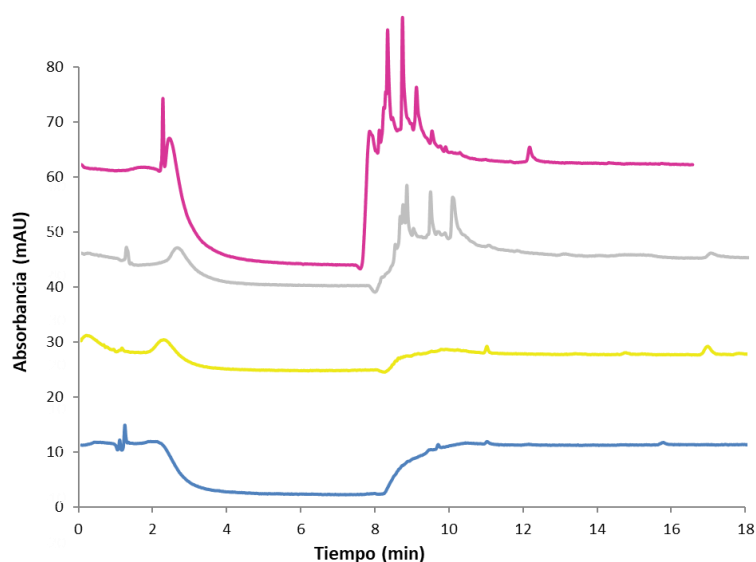


Figura 27. Cromatogramas obtenidos al procesar agua nanopura (4 mL + 100 μ L) usando diferentes porcentajes de acetonitrilo en la fase móvil, 20 % (azul), 30 % (amarillo), 80 % (gris) y 95 % (morado).

Durante la optimización se observó que el porcentaje de acetonitrilo de la fase móvil no solo influía en el tiempo de retención (t_r) de los picos del fondo, sino también en la intensidad de éstos. Este fenómeno se puede observar en la Figura 27, en la que se muestran los cromatogramas obtenidos al procesar agua nanopura (4 mL + 100 μ L) por un capilar TRB-5 y variar el porcentaje de acetonitrilo de la fase móvil. Como se observa en la Figura 27, cuando el contenido de acetonitrilo en la fase móvil era elevado (80 - 95 %) se obtenían gran cantidad de picos de fondo en la primera parte del cromatograma (8–11 min), lo que imposibilitaba la cuantificación de la 2-hidroxi-terbutilazina y dificultando la estimación de la desetil-terbutilazina.

En la Figura 28, se muestran los espectros de UV registrados para algunos de los picos de fondo, obtenidos con un 95 % de acetonitrilo en la fase móvil. Dos de estos picos fueron identificados, por comparación de los tiempos de retención y el espectro UV obtenidos al procesar disoluciones patrón de ambos compuestos, como dietilftalato (DEP) y dietilhexilftalato (DEHP) (ver Figura 28). Ambos ftalatos son contaminantes típicos en los laboratorios ya que se encuentran presentes en el material plástico de infinidad de utensilios y recipientes (Frankhauser-Noti & Grob, 2007).

Por otro lado, como se puede observar en la Figura 27, al emplear una fase móvil con un porcentaje de acetonitrilo inferior al 30 % se obtuvieron cromatogramas mucho más limpios. Al disminuir el porcentaje de acetonitrilo, la fuerza elutrópica de la fase móvil es menor y las impurezas no son desorbidas por la fase móvil quedando retenidas en la fase de extracción. A pesar de que se obtuvieron cromatogramas más limpios utilizando una fase móvil con un 20 % de acetonitrilo, bajo estas condiciones no fue posible separar los picos de la desetil-terbutilazina y la atrazina, imposibilitando la cuantificación de ambos compuestos.

Finalmente, se estableció un compromiso entre la resolución cromatográfica y el tiempo de análisis, seleccionando como fase móvil una mezcla de agua y acetonitrilo con un 30 % del disolvente orgánico. Bajo estas condiciones se consiguió una buena resolución cromatográfica, y solo se observaron dos picos de compuestos interferentes con baja intensidad, identificados como DEP (t_r = 10.8 min) y DEHP (t_r = 16.3 min).

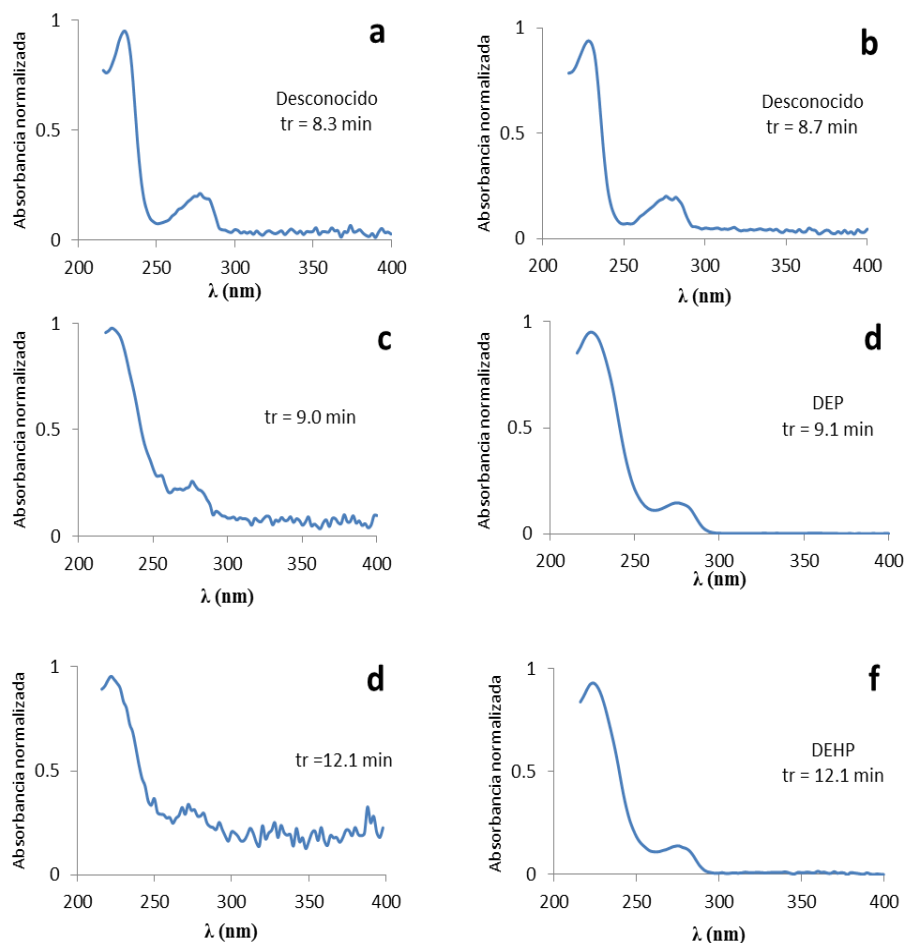


Figura 28. Espectros UV normalizados de los picos observados en el cromatograma de la Figura 20. Los espectros corresponden al pico con tr a) 8.3 min, b) 8.7 min, c) 9.0 min, e) 12.1 min; y disoluciones patrón de d) DEP, 9.1 min y f) DEHP, 12.1 min. Fase móvil con 95 % de acetonitrilo (v/v).

Modificación de la fase de extracción

Con el fin de mejorar la capacidad de extracción de la fase comercial TRB-5, ésta se modificó inmovilizando c-SWCNTs y c-MWCNTs sobre la superficie del material sorbente. La inmovilización se realizó utilizando glutaraldehído como agente entrecruzante (Sección 3.4.1).

Antes de estudiar la capacidad de extracción de estas fases se evaluó la precisión de la funcionalización de las columnas capilares, ensayando diferentes síntesis de columnas modificadas. La Tabla 21 muestra la RSD obtenida empleando las columnas de TRB-5 comercial y las columnas de TRB-5 modificadas (c-SWCNTs-TRB-5 y c-MWCNTs-TRB-5). Como se puede observar en la Tabla 21, no existen diferencias significativas entre los valores de RSD obtenidos para las columnas estudiadas. Por tanto se puede afirmar que la inmovilización de los c-CNTs en las columnas capilares de TRB-5 es un proceso reproducible.

Tabla 21. Precisión (RSD, %) obtenida al procesar una mezcla de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de los analitos con las columnas de extracción estudiadas ($n = 3$).

Analito*	TRB-5	c-SWCNTs-TRB-5	c-MWCNTs-TRB-5
2-Hidroxi-terbutilazina	1.2	1.2	2.0
Desetil-terbutilazina	1.2	1.5	7.0
Atrazina	4.0	6.0	8.0
Propazina	4.0	3.0	2.0
Terbutilazina	1.0	1.4	2.0

Seguidamente se estudió la eficiencia de extracción de las columnas modificadas. Para ello se compararon los valores de área de pico obtenidos al procesar con cada una de las columnas una disolución patrón que contenía $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada triazina y empleando como fase móvil una mezcla de agua y acetonitrilo (70:30). La Figura 29 muestra los valores de área obtenidos para cada analito empleando las columnas recubiertas con las fases TRB-5, c-SWCNTs-TRB-5 y c-MWCNTs-TRB-5. Los resultados obtenidos indican que la columna TRB-5 modificada con c-SWCNTs presenta para los analitos atrazina, propazina y terbutilazina mayor capacidad de extracción que la columna TRB-5. Similares resultados se obtienen con la columna modificada con c-MWCNTs, aunque en este caso el área de pico de la terbutilazina es menor que la obtenida con la columna sin modificar. Sin embargo, la capacidad de extracción para los compuestos más polares 2-hidroxi-terbutilazina y desetil-terbutilazina empeora cuando la columna TRB-5 se modifica con c-CNTs, ya que las señales analíticas son inferiores a las obtenidas con la columna sin modificar.

En la Sección 4.1.1.3 se estudia y se justifica detalladamente qué interacciones tienen lugar entre la fase de extracción modificada con c-CNTs y los analitos. Adicionalmente se evaluó la capacidad de extracción de las fases TRB-5 y TRB-35 modificadas con c-CNTs, empleando como analitos triazinas y otros contaminantes ambientales como diferentes PAHs o el piriproxifeno.

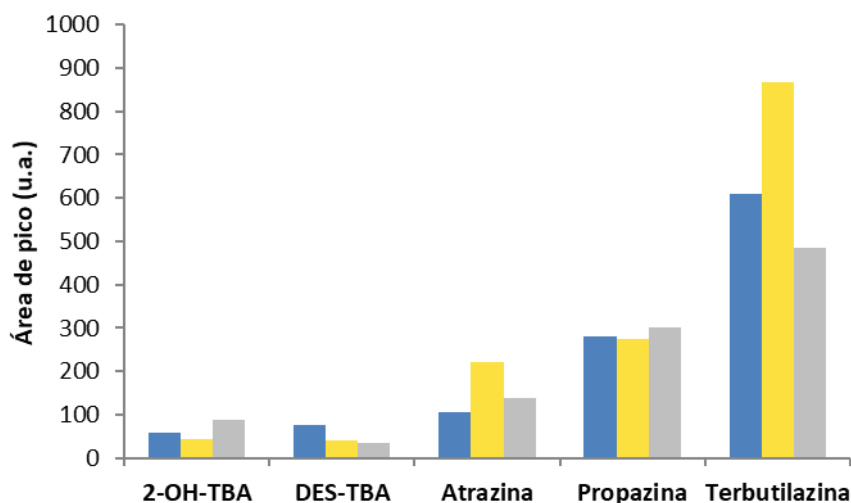


Figura 29. Áreas de pico obtenidas para cada analito, con las columnas capilares TRB-5 (amarillo), c-SWCNTs-TRB-5 (azul) y c-MWCNTs-TRB-5 (gris).

A partir de la relación entre la señal obtenida para la columna modificada y la señal en la columna sin modificar se estimó la eficiencia de extracción de las columnas modificadas. Los valores obtenidos para los analitos 2-hidroxi-terbutilazina, desetil-terbutilazina, atrazina, propazina y terbutilazina con la fase c-SWCNTs fueron 0.8, 0.6, 2.0, 1.1 y 1.4, respectivamente; y para la fase c-MWCNTs fueron 0.3, 0.4, 1.3, 1.1 y 0.8. Teniendo en cuenta estos resultados, se puede concluir que la inmovilización de c-SWCNTs o c-MWCNTs en las columnas comerciales TRB-5 no supone una mejora sustancial de la capacidad de extracción para las triazinas estudiadas en las condiciones de trabajo, especialmente para los compuestos más polares.

La ligera mejora en la capacidad de extracción encontrada para algunos compuestos no compensaba la dedicación necesaria para modificar las columnas comerciales. Por ello, se seleccionó la columna comercial TRB-5 como la mejor opción para la extracción de triazinas. En la Figura 30 se muestran los cromatogramas obtenidos para un blanco y una disolución patrón de una mezcla de todos los analitos, empleando 40 cm de un capilar TRB-5 para la extracción. Como se deduce de dicha figura, se obtuvo una satisfactoria separación cromatográfica para todas las triazinas.

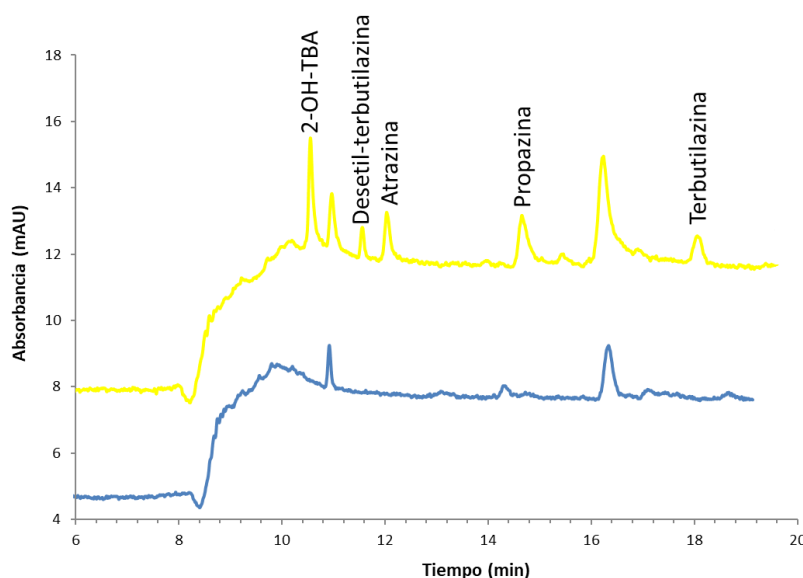


Figura 30. Cromatogramas obtenidos a 230 nm al procesar 4 mL de agua nanopura (azul) y disolución patrón mezcla de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de 2-OH-TB, $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de DES-TBA, $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de atrazina y propazina y $0.25 \mu\text{g L}^{-1}$ de terbutilazina (amarillo).

Por otro lado se optimizó el volumen de muestra. Para ello se procesaron diferentes volúmenes (1 – 5 mL) de una disolución patrón conteniendo una mezcla de los analitos. Los resultados indicaron que para los analitos más polares el aumento del volumen de muestra procesado supone un discreto incremento del área de pico. Estos resultados sugieren que para los compuestos más polares se produce la autoelución al procesar 5 mL de muestra. Por otro lado, para la terbutilazina, el compuesto menos polar, al incrementar el volumen de muestra de 1 mL a 4 mL se produce un incremento sustancial de la señal analítica, duplicándose el área de pico. Sin embargo, al procesar 5 mL no se observó un incremento significativo de la señal analítica. Por ello se seleccionó 4 mL como el volumen de muestra óptimo.

Estudio de los parámetros analíticos

Una vez optimizado el procedimiento de extracción, se evaluaron los parámetros analíticos más relevantes: linealidad, LOD, LOQ y precisión. Para ello, se procesaron diferentes disoluciones patrón que contenían mezclas de las triazinas y productos de degradación estudiados. Los LODs y LOQs se determinaron experimentalmente procesando disoluciones patrón cada vez más diluidas. El LOD se estableció como la concentración de analito cuya área de pico era 3 veces superior a la relación señal-ruido del blanco. Se tomó la concentración de analito cuya señal analítica era 10 veces superior a dicha relación para establecer el LOQ. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 22. Cabe mencionar que también se verificó la ausencia de efecto memoria procesando un blanco de agua nanopura entre inyecciones consecutivas de las disoluciones patrón.

Como se observa en la Tabla 22, en todos los casos se obtuvo una respuesta lineal para concentraciones menores a $50 \mu\text{g L}^{-1}$; los LODs se encuentran en el rango de 0.02 a $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$, y los LOQs varían de 0.08 a $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$. La sensibilidad obtenida resultó suficiente para que el método propuesto pueda ser utilizado para monitorizar triazinas y sus productos de degradación en muestras de agua. A este efecto cabe resaltar que la Unión Europea establece en los Estándares de Calidad Ambiental que la concentración media anual permitida de atrazina en aguas superficiales es $0.6 \mu\text{g L}^{-1}$ y $2 \mu\text{g L}^{-1}$ la concentración máxima permitida (Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, del 12 de agosto de 2013).

Tabla 22. *Parámetros analíticos obtenidos con el método propuesto.*

Analito	Intervalo lineal ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recta de calibrado ($y = a + bx$)			LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LC ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Reproducibilidad ^a RSD (%) (n = 3)	
		$a \pm s_a$	$b \pm s_b$	R^2			Interdía	Intradía
2-OH-TBA	0.25 – 50.0	0.1 ± 1.0	1.48 ± 0.04	0.992	0.08	0.25	8	17
DES-TBA	0.50 – 50.0	-3 ± 2	2.81 ± 0.08	0.992	0.10	0.50	7	11
Atrazina	0.25 – 50.0	-2 ± 3	7.9 ± 0.2	0.999	0.04	0.15	3	11
Propazina	0.25 – 50.0	-8 ± 4	14.0 ± 0.2	0.999	0.04	0.15	3	13
Terbutilazina	0.10 – 50.0	-4 ± 6	25.9 ± 0.3	0.999	0.02	0.08	9	7

^a Para una concentración de $10 \mu\text{g L}^{-1}$.

Finalmente, se evaluó la precisión del procedimiento propuesto procesando disoluciones mezcla de concentración $10 \mu\text{g L}^{-1}$ en cada uno de los compuestos. Como se puede ver en la Tabla 22, se midió tanto la precisión intra-día como inter-día, obteniéndose valores de RSD inferiores al 9 % y al 17 %, respectivamente. Considerando los resultados obtenidos, se puede concluir que la precisión obtenida es satisfactoria.

Análisis de muestras

El método propuesto se empleó para la determinación y, en su caso, cuantificación de triazinas y productos de degradación en muestras de agua de mar y transición. En la Figura 31, se muestran los cromatogramas obtenidos para algunas de las muestras procesadas. No se encontró ninguno de los analitos incluidos en el estudio descrito, a excepción de una muestra de agua de transición en la cual se encontró terbutilazina (Figura 31); la señal analítica puso de manifiesto que la concentración de este pesticida en la muestra analizada se encontraba próxima a su LOQ.

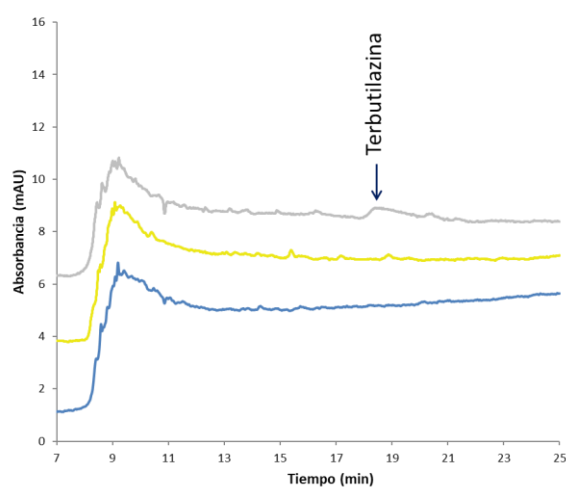


Figura 31. Cromatogramas obtenidos a 230 nm para dos muestras analizadas de agua de mar (azul y amarillo) y una de agua transición (gris).

Cabe destacar (Figura 31) que no se observaron los picos correspondientes a la contaminación de ftalatos u otros compuestos orgánicos en aguas de mar y de transición, a diferencia de lo observado al procesar las disoluciones patrón preparadas en agua nanopura (Figura 27). Estos resultados refuerzan la idea de que los ftalatos observados procederían del sistema de purificación de agua, ya que solo aparecieron cuando se procesaron las disoluciones patrones preparadas en agua nanopura. Por tanto, puede considerarse que el método tiene una excelente selectividad para el análisis de muestras de agua de mar y transición.

Seguidamente se estudió la existencia de efecto matriz. Para ello se realizaron diferentes estudios de recuperación, fortificando las muestras con $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito, evaluándose la recuperación como la relación entre el área obtenida para la muestra fortificada y el área correspondiente a un patrón de la misma concentración. Los valores de recuperación obtenidos se encuentran en el intervalo de 98 % - 120 % (Tabla 23). Por otro lado, se comprobó que los LODs y LOQs eran los mismos independientemente de que el patrón se preparara en agua nanopura o en muestra. Por todo ello se puede concluir que el método no está afectado de efecto matriz.

Finalmente, se evaluó la exactitud del método fortificando las muestras con todos los analitos estudiados a dos niveles diferentes de concentración (2.6 y $25.5 \mu\text{g L}^{-1}$). Para la cuantificación de la concentración añadida a las muestras, se emplearon las rectas de calibrado calculadas a partir de las disoluciones patrón preparadas en agua nanopura. Las concentraciones calculadas son estadísticamente similares a las concentraciones añadidas (Tabla 23). Por tanto, se concluyó que el método propuesto proporcionaba buena exactitud.

Tabla 23. Resultados obtenidos en el estudio del efecto matriz y de la exactitud.

Analito	Recuperación ^a (%) (n = 3)	Exactitud (n = 3)	
		Concentración añadida (µg L ⁻¹)	Concentración calculada (µg L ⁻¹)
2-Hidroxi-terbutilazina	100 ± 2	2.6	2.6 ± 0.2
		25.5	25.2 ± 0.2
Desetil-terbutilazina	98 ± 2	2.6	3.04 ± 0.07
		25.5	28 ± 2
Atrazina	114 ± 5	2.6	2.39 ± 0.09
		25.5	29 ± 1
Propazina	120 ± 4	2.6	2.4 ± 0.3
		25.5	29.0 ± 0.9
Terbutilazina	106 ± 7	2.6	2.7 ± 0.2
		25.5	24 ± 1

^a Establecido a partir de una concentración de 10 µg L⁻¹

Comparación con otros procedimientos

La extracción y preconcentración de contaminantes polares presentes en muestras de agua es a día de hoy, uno de los retos a los que se enfrenta la Química Analítica. Por ello, durante los últimos años se ha hecho un gran esfuerzo para el desarrollo de nuevas técnicas y sorbentes que mejoren la eficiencia y la selectividad de la extracción de pesticidas polares. A este respecto, se han tenido en cuenta los principios de la QAV, especialmente en el desarrollo de procedimientos más simples y miniaturizados, así como en la reducción de la cantidad de reactivos usados y residuos generados.

En la Tabla 24, se muestran las características más relevantes de algunos métodos de microextracción y análisis descritos en la literatura para la determinación de triazinas en muestras de agua.

La SPME en fibra es una técnica ampliamente utilizada ya que se trata de un procedimiento sencillo y se puede acoplar a GC y LC. Sin embargo, el elevado tiempo de extracción y los bajos coeficientes de extracción conseguidos para analitos polares han motivado la búsqueda de otras técnicas de extracción como SBSE, la mixcroextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME), la microextracción líquido-líquido-sólido (LLSME), la microextracción líquida sobre fibra hueca (HF-LPME) o la mixcroextracción en fase sólida sobre membrana (SPMTE). Todas estas técnicas son mejores que la SPE en términos de consumo de reactivos y materiales, y generación de residuos. Además todas proporcionan una adecuada sensibilidad y selectividad para la determinación de triazinas; no obstante no han sido aplicadas a la determinación de productos de degradación.

La IT-SPME puede ser utilizada para la determinación de triazinas polares y sus productos de degradación, siendo los LODs obtenidos comparables a los obtenidos por otras técnicas de microextracción (Tabla 24). Solo el método basado en SBSE, que combina SPE y SPME, es superior en términos de sensibilidad al método propuesto. A diferencia de los métodos descritos en la Tabla 24, el método propuesto es más rápido y sostenible, con una menor huella de carbono, ya que únicamente requiere 3 min para el tratamiento de la muestra y el análisis tiene lugar en menos de 30 min. Además no requiere disolventes ni materiales adicionales, ya que únicamente se utilizan 100 μL de agua nanopura.

Tabla 24. Métodos propuestos para el análisis de triazinas en muestras de agua que hacen uso de técnicas de microextracción.

Analitos / muestra	Técnica de extracción	Procedimiento de extracción	LODs ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Referencia
Triazinas / agua de río	DLLME	<ul style="list-style-type: none"> - Se filtran 5 mL de muestra y se añade NaCl 4 % - Se añade 1 mL de acetona (dispersante) y 12 μL de clorobenceno (dis. extractante), centrifugar 5 min - Se separan los extractos y se miden por GC-MS 	0.021 - 0.12	Nagaraju & Huang, 2007
Triazinas / agua de lodo	LLSME y HF-LPME	<p>LLSME:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Se extraen los analitos (3 mL de muestra) con una fibra recubierta con un MIP - Se desorben los analitos durante 10 mL con 200 μL de metanol en una interface de LC-UV <p>HF-LPME:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Se extraen los analitos (3 mL de muestra) con una fibra hueca con 6 μL de octanol durante 30 min - Se analiza la fase aceptora por LC-UV 	0.07 - 0.20 0.18 - 0.30	Hu, Wang, Hu & Li, (2009)
Triazinas / agua de río	SPMTE	<ul style="list-style-type: none"> - Se aspiran y expulsan 600 μL de muestra (15 mL) empleando una punta de pipeta rellana con un polímero de polipropileno con MWCNTs. El proceso se repite 5 veces - Se extraen los analitos con 100 μL de acetonitrilo en baño de ultrasonidos y se inyectan en LC-UV 	0.2 - 0.5	See, Sanagi, Ibrahim & Naim, (2010)
Triazinas / agua de río	μ -SPE in jeringa	<ul style="list-style-type: none"> - Se aspiran y expulsan varias veces 7 mL con una jeringa con polidifenilamina - Se desorben los analitos con 200 μL de acetonitrilo y se procesan por LC-UV - Se evapora el extracto y se reconstituye con 10 μL de acetonitrilo, que se procesa por GC-MS 	0.05 - 0.1	Bagheri, Ayazi, Es'haghi & Aghakani, (2012)

Tabla 24. *continuación.*

Analitos / muestra	Técnica de extracción	Procedimiento de extracción	LODs ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Referencia
Triazinas / agua de lago	SPME	<ul style="list-style-type: none"> - Se sumerge una fibra de PDMS-DVB y CW-TR en 3 mL de muestra durante 20 min - Los analitos se desorben durante 2 min en una interfaz SPME-LC y se analizan por LC-UV 	1.2 – 3.4	Huang, Huang & Sung, (2004)
Triazinas / agua de acequia	SPME	<ul style="list-style-type: none"> - Se extraen fibras de PDMS en 7.5 mL de muestra durante 45 min - Se desorben térmicamente los analitos durante 15 min en un inyector de GC-MS 	0.25 – 0.50	Rocha, Pappas & Huang, (2008)
Triazinas / agua doméstica	SPME	<ul style="list-style-type: none"> - Se extraen con una fibra de aluminio recubierta con un MIP en 3 mL de muestra durante 12 min - Se desorben térmicamente los analitos durante 1 min y analizados con GC-FID 	9 -98	Djozan, et al., (2010)
Triazinas / agua doméstica	SPE-MSPE	<ul style="list-style-type: none"> - Se filtra 1L de muestra por cartuchos C18, los analitos son desorbiendo con 5 mL de ACN y metanol - Se evapora el extracto y se reconstituye con 100 μL de acetona y 6900 μL de agua - Se extraen los analitos con una fibra de PDMS durante 30 min y se desorben los analitos térmicamente durante 5 min en el inyector de GC-MS 	0.0011	Bonansea, Amé & Wunderlin (2013)
Triazinas / agua subterránea	SPME	<ul style="list-style-type: none"> - Se extraen los analitos con una fibra de PDMS 20 mL de muestra con 30 % de NaCl. Durante 60 min. Se desorben los analitos durante 5 min en una trampa fría acoplada a GC-MS 	(0.2 – 3.4) 10^{-3}	Sánchez-Ortega, et al., (2009)
Triazinas y productos degradados / aguas	IT-SPME	<ul style="list-style-type: none"> - Se inyectan 4 mL de muestra seguidos de 100 μL de agua nanopura en el capilar de extracción. La fase móvil desorbe los analitos y los porta al sistema CapLC-DAD 	0.02 – 0.10	Método propuesto

Conclusiones

Los resultados obtenidos demuestran por primera vez, que el uso de IT-SPME en válvula empleando como fase de extracción columnas capilares de CG comerciales es una alternativa válida para la determinación de triazinas polares y sus productos de degradación. Las condiciones cromatográficas y de extracción deben ser seleccionadas con el fin de conseguir una adecuada extracción y transferencia de todos los analitos que hayan quedado retenidos en la fase de extracción, así como para evitar la aparición de picos de fondo correspondientes a la presencia de otros contaminantes potencialmente presentes en el agua nanopura.

Respecto al uso de columnas de extracción TRB-5 modificadas con c-CNTs, no se logró una mejora significativa de la capacidad de extracción para triazinas y sus principales productos de degradación respecto a la columna TRB-5 sin modificar.

Además, el método propuesto combina el uso de CapLC y el procesado de volúmenes relativamente grandes de muestra para la rápida determinación de triazinas y productos de degradación, pudiéndose incrementar la sensibilidad utilizando un capilar de mayor longitud. La sensibilidad es suficiente para la monitorización de triazinas y productos de degradación en aguas medioambientales según los estándares marcados por la legislación europea (Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, del 12 de agosto de 2013). Finalmente, cabe destacar que se trata de un método rápido, fácil de implementar y sostenible, que cumple con los principios de la QAV.

4.1.1.3 Evaluación de capilares recubiertos con PDMS modificado con c-CNTs para IT-SPME-CapLC-DAD

Como se ha mostrado anteriormente, la utilización de columnas TRB-5 modificadas con c-SWCNTs y c-MWCNTs como fase de extracción en IT-SPME no es una buena opción para las triazinas y sus productos de degradación.

En el siguiente apartado se discute sobre qué tipo de interacciones pueden tener lugar entre la fase de extracción y los analitos, para tratar de interpretar los resultados obtenidos. Además se ha ampliado el estudio a columnas de PDMS TRB-35 que también se han modificado, para la extracción de triazinas y otros compuestos como piriproxifeno y algunos PAHs. Respecto de los PAHs, se han seleccionado el naftaleno, el benzo[b]fluoranteno y el dibenzo[a,h]antraceno, puesto que estos tres compuestos poseen una estructura con diferente número de anillos aromáticos (Tabla 12), y por tanto cubren un amplio rango de polaridades ($\log K_{ow} = 3.37 - 6.86$).

Caracterización de los c-CNTs y las columnas modificadas

En primer lugar se comprobó que el proceso de carboxilación se había producido adecuadamente. Para ello, se obtuvieron mediante ATR-FTIR los espectros de los nanotubos carboxilados c-SWCNTs y c-MWCNTs sintetizados después de la etapa de oxidación (Figura 32). En ambos espectros se observó una banda a 1360 cm^{-1} , que corresponde a la flexión del grupo CH_2 unido a un grupo carboxilo. También en ambos casos se pudieron observar dos bandas muy intensas sobre 1120 cm^{-1} y 1710 cm^{-1} ; estas bandas se corresponden con el estiramiento de los enlaces C-O y C=O, respectivamente. La presencia de estas tres bandas indica la existencia de grupos carboxilo en los nanotubos, y por tanto, se pudo concluir que la carboxilación de los CNTs se había producido de manera satisfactoria.

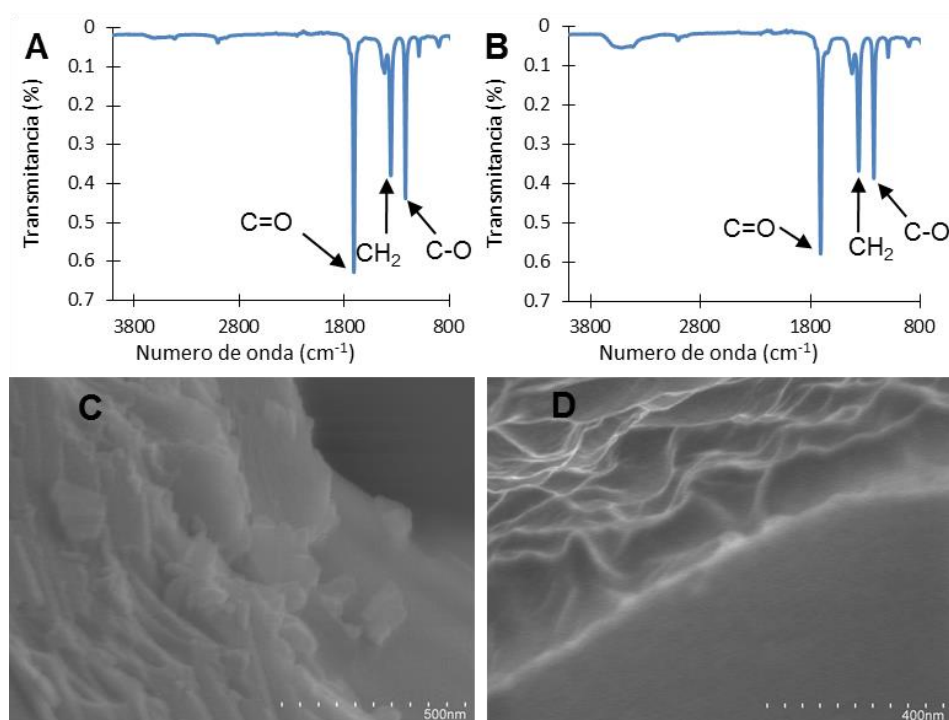


Figura 32. Espectros IR de los A) c-SWCNTs y B) c-MWCNTs; imágenes SEM de los capilares c) c-SWCNTs-TRB-5 y d) c-MWCNTs-TRB-5.

Una vez comprobado que los nanotubos se habían oxidado, se procedió a su inmovilización en las columnas TRB-5 y TRB-35. También se comprobó que la inmovilización de los c-CNTs en las columnas de PDSM comerciales se había producido satisfactoriamente. La Figura 32 muestra las imágenes SEM de la superficie interior para la columna comercial TRB-5 modificada con c-SWCNTs y c-MWCNTs. En ambas imágenes se puede observar que las paredes internas del capilar están recubiertas por una capa homogénea, la cual corresponde a los c-CNTs. Se observó un recubrimiento similar para las columnas modificadas de TRB-35.

Estudio de la capacidad de extracción de compuestos heterocíclicos nitrogenados

En primer lugar se evaluó la capacidad de extracción de las fases modificadas para la extracción y preconcentración de compuestos heterocíclicos nitrogenados. Los analitos seleccionados para realizar este estudio fueron las triazinas 2-hidroxi-terbutilazina, desetil-terbutilazina, terbutilazina, atrazina y propazina, así como el insecticida piriproxifeno. La Figura 33 muestra la respuesta analítica obtenida al procesar por las diferentes columnas de extracción 4 mL de una disolución que contenía una mezcla de triazinas de concentración $50 \mu\text{g L}^{-1}$ y piriproxifeno de concentración $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Por otro lado, se determinaron experimentalmente los LODs para todos los analitos con las diferentes columnas analíticas estudiadas (Tabla 25).

Los resultados plasmados en la Figura 33 muestran que la columna TRB-35 tiene mayor capacidad de extracción para las triazinas que las columnas TRB-5. Para interpretar este comportamiento hay que tener en cuenta que la columna TRB-35 contiene un 30 % más de grupos difenilo que la columna TRB-5; esto implica que la polaridad es diferente, ya que a mayor porcentaje de grupos difenilo mayor es la polaridad. Por otro lado, las triazinas son compuestos polares ($\log K_{ow} = 1.82 - 3.21$) por tanto, cabe esperar una mayor interacción con la fase más polar, es decir con la columna TRB-35. Por el contrario, la capacidad de extracción del piriproxifeno de la columna TRB-5 es mayor que la de la columna TRB-35, ya que el analito es el más apolar ($\log K_{ow} = 5.37$). Los LODs obtenidos están en consonancia con estas observaciones (ver Tabla 25).

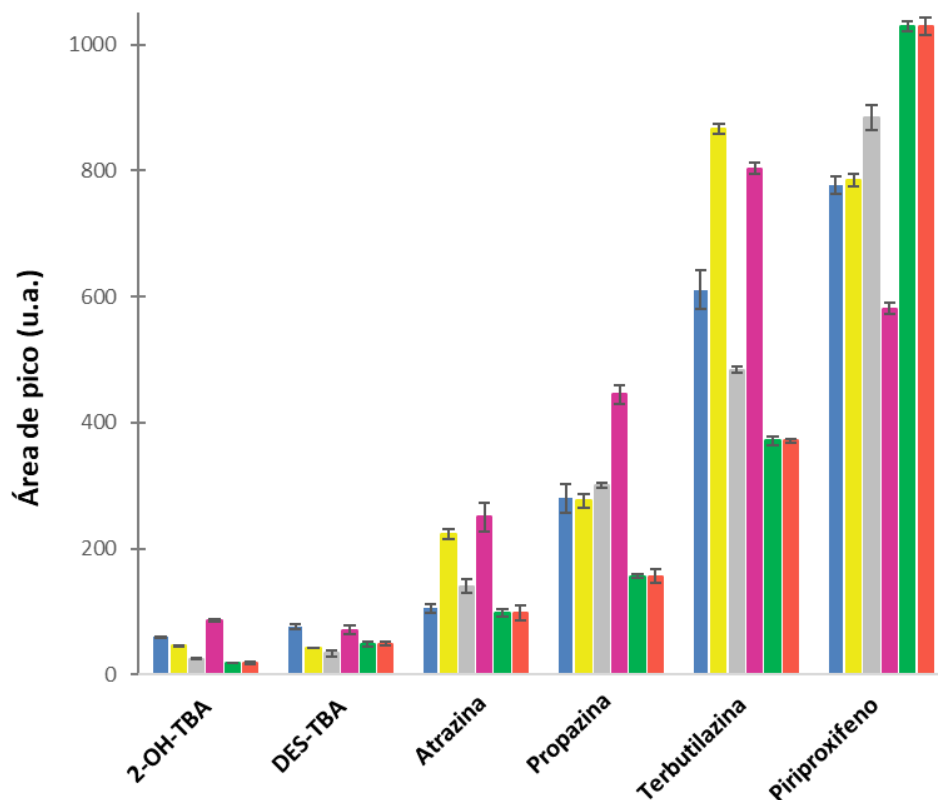


Figura 33. Respuesta analítica de los compuestos heterocíclicos nitrogenados ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) empleando las columnas comerciales y modificadas: TRB-5 (azul), c-SWCNTs-TRB-5 (rojo), c-MWCNTs-TRB-5 (verde), TRB-35 (morado), c-SWCNTs-TRB-35 (gris) y c-MWCNTs-TRB-35 (naranja). Las barras de error representan la desviación estandar para $n = 3$.

La interpretación de los resultados obtenidos para las columnas modificadas con c-SWCNTs y c-MWCNTs debe ser abordada desde el punto de vista del tipo de interacciones que pueden establecerse entre las triazinas y los c-CNTs. Las triazinas pueden interaccionar con los CNTs a través de interacciones tipo π - π . Sin embargo, en este trabajo se han inmovilizado c-CNTs, es decir CNTs que contienen grupos carboxilo. Estos grupos pueden interaccionar a través de interacciones de tipo intercambio iónico y mediante puentes de hidrógeno (Whang et al., 2014), además de por interacciones de tipo π - π .

Tabla 25. LODs obtenidos con las diferentes fases de extracción estudiadas para todos los analitos seleccionados.

Columnas capilares	TRB-5			c-SWCNTs-TRB-5			c-MWCNTs-TRB-5			TRB-35			c-SWCNTs-TRB-35			c-MWCNTs-TRB-35		
	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD (%)		LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD (%)		LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD (%)		LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD (%)		LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD (%)		LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD (%)	
2-Hidroxi-terbutilazina	5	1.2		7	1.8		12	2		3.5	4.3		16	1.2		14	6.1	
Desetil-terbutilazina	4	1.9		7	1.2		9	6.5		4	5.2		6	4.1		7	3.8	
Atrazina	3	3.8		1.3	3.8		2	7.7		1.2	7.3		3	6.0		4	6.9	
Propazina	1.1	2.3		1.1	3.9		2	1.1		0.7	3.4		1.9	2.2		5	2.1	
Terbutilazina	0.5	1.5		0.4	0.9		0.6	1.1		0.4	1.6		0.8	1.8		1.3	1.2	
Piriproxifeno	0.08	1.8		0.08	1.2		0.07	2.2		0.1	1.6		0.06	0.8		0.05	1.2	
Naftaleno	0.23	7.3		0.06	5.7		0.07	4.9		0.15	7.6		0.23	6.5		0.33	5.1	
Benzo[b]fluoranteno	0.17	8.5		0.03	2.8		0.07	7.7		0.35	2.7		0.37	1.5		0.21	4.0	
Dibenzo[a, h]antraceno	0.88	4.2		0.14	6.8		0.29	6.3		3.85	6.4		0.33	8.6		0.83	4.7	

Experimentalmente se observó que al modificar las columnas comerciales TRB-35 con c-CNTs la señal analítica disminuía y los LODs aumentaban (Figura 33 y Tabla 25). Por el contrario, al inmovilizar c-SWCNTs en las columnas comerciales TRB-5 se observó un aumento de la señal analítica respecto a la señal obtenida con la columna TRB-5 para la atrazina, la propazina y la terbutilazina. Este aumento de la capacidad de extracción puede deberse a una mayor interacción entre las triazinas y la fase de extracción, ya que a las interacciones de tipo π - π se suman las interacciones tipo puente de hidrógeno e intercambio iónico entre las triazinas y los grupos carboxilo de los nanotubos. No obstante, la señal analítica obtenida con la columna c-SWCNTs-TRB-5 es muy similar a la obtenida con la columna TRB-35 sin modificar.

En el caso del piriproxifén, la Tabla 25 muestra que, de todas las fases de extracción estudiadas, la fase c-MWCNTs-TRB-35 es la que proporcionó menor LOD. El aumento de la capacidad de extracción al inmovilizar c-MWCNTs en la fase de extracción TRB-35 puede ser debido al aumento de las interacciones tipo π - π entre el analito y los c-CNTs inmovilizados en la superficie del capilar (Wang et al., 2010).

Estudio de la capacidad de extracción para hidrocarburos aromáticos policíclicos

Seguidamente se estudió la capacidad de extracción para los PAHs seleccionados en las diferentes fases de extracción desarrolladas. Dado que los PAHs incluyen gran cantidad de compuestos con un amplio intervalo de estructuras, para realizar el estudio, se han seleccionado tres compuestos aromáticos con diferente polaridad: naftaleno ($\log K_{ow} = 3.37$), benzo[b]fluoranteno ($\log K_{ow} = 6.04$) y dibenzo[a,h]antraceno ($\log K_{ow} = 6.86$). Como se puede observar todos ellos son más apolares que las triazinas.

La Figura 34 muestra la señal analítica obtenida al analizar una disolución patrón conteniendo una mezcla de los distintos analitos en concentración $100 \mu\text{g L}^{-1}$ para cada uno de ellos. Como era de esperar, para el compuesto menos apolar, el naftaleno, la columna TRB-35 (más polar) proporciona mayor señal analítica que la columna TRB-5. Sin embargo, para los compuestos de menor polaridad, la columna con menos grupos difenilo proporciona mayor respuesta analítica. Estos resultados pueden ser explicados atendiendo a la diferente polaridad de las dos fases comerciales.

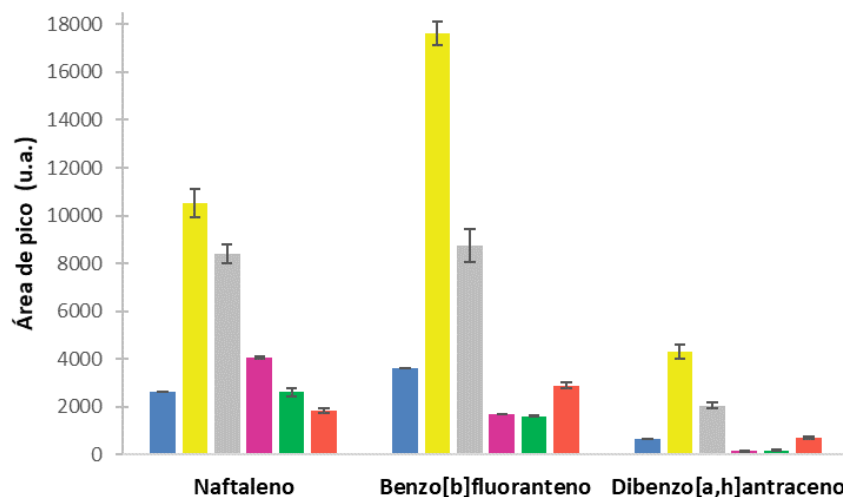


Figura 34. Respuesta analítica para los PAHs con los capilares ensayados: TRB-5 (azul), c-SWCNTs-TRB-5 (amarillo), c-MWCNTs-TRB-5 (gris), TRB-35 (morado), c-SWCNTs-TRB-35 (verde) y c-MWCNTs-TRB-35 (rojo). Las barras de error representan la desviación estándar para $n = 3$.

Por otro lado, como se puede observar en la Figura 34, al inmovilizar c-CNTs en la columna comercial TRB-5 se produce un aumento muy significativo de la señal analítica, independientemente de la polaridad del analito y por tanto una disminución de los LODs (Tabla 25). Estos resultados, pueden ser debidos al incremento de las interacciones de tipo π - π entre los anillos aromáticos de los PAHs y los c-CNTs inmovilizados en la fase de extracción. Respecto a las columnas TRB-35 modificadas, se observa un ligero incremento del área de pico cuando se modifica la columna con c-MWCNTs para los PAHs más apolares. Posiblemente este incremento de la señal también se deba a un aumento de las interacciones de tipo π - π .

Evaluación de la precisión

Seguidamente se evaluó la precisión a un nivel de concentración de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ para las triazinas y piriproxifén, y $100 \mu\text{g L}^{-1}$ para los PAHs. La RSD obtenida para las diferentes fases estudiadas se muestra en la Tabla 25. Para todas las fases estudiadas, los valores de RSD fueron inferiores al 9 % cuando se procesó una disolución patrón por la misma columna. Por otro lado, la RSD se incrementó hasta el 19 % cuando se compararon las áreas de pico obtenidas para todos los analitos al procesar la misma disolución por capilares con la misma fase de extracción, pero sintetizados en días diferentes. Estos resultados ponen de manifiesto que el uso de columnas de PDMS modificadas con c-CNTs como fase de extracción para IT-SPME es una opción satisfactoria.

Evaluación de la relación entre la capacidad de extracción y el $\log K_{ow}$

Para evaluar la capacidad de extracción de las diferentes columnas se definió el índice de preconcentración (IP) como la relación entre la señal obtenida con la columna modificada con c-CNTs respecto del área de pico obtenida para la columna sin modificar. Los IPs obtenidos para todos los analitos y fases de extracción se muestran en la Tabla 27. Como se puede observar en dicha tabla, no existe una clara relación entre el IP y el valor de $\log K_{ow}$. Por tanto, se puede concluir que la polaridad no es el único factor que influye en la capacidad de extracción.

La presencia de grupos funcionales en los analitos es una variable que puede influir en la capacidad de extracción, ya que éstos definirán las interacciones que pueden tener lugar con el sorbente. En este caso, los c-CNTs inmovilizados en la fase de extracción pueden interaccionar con los analitos a través de interacciones tipo π - π , puentes de hidrogeno e intercambio iónico, siendo la primera la predominante en este estudio a causa de la presencia de anillos aromáticos en los analitos.

Tabla 26. *IPs obtenidos para todos los analitos.*

	log K _{ow}	c-SWCNTS TRB-5	c-MWCNTS TRB-5	c-SWCNTS TRB-35	c-MWCNTS TRB-35
2-Hidroxi-terbutilazina	1.82	0.6	0.4	0.2	0.2
Desetil-terbutilazina	2.30	0.8	0.4	0.7	0.9
Atrazina	2.61	2.1	1.3	0.4	0.3
Propazina	2.93	1.0	1.1	0.4	0.1
Terbutilazina	3.21	1.4	0.8	0.5	0.3
Naftaleno	3.37	4.0	3.2	0.6	0.5
Piriproxifén	5.37	1.0	1.1	1.8	1.9
Benzo[b]fluoranteno	6.04	4.9	2.4	0.9	1.7
Dibenzo[a,h]antraceno	6.86	6.3	3.0	1.2	4.6

Los valores más altos de IP se obtuvieron para los PAHs cuando se utilizó la columna recubierta con la fase c-SWCNTs-TRB-5. Este hecho puede ser atribuido a la fuerte interacción de tipo π - π que cabe esperar entre los anillos aromáticos y los c-CNTS. Cabe destacar que la capacidad de extracción aumenta cuando lo hace la deslocalización electrónica de la molécula (Kragulj et al., 2013).

Conclusiones

En este trabajo se ha evaluado la capacidad de extracción de columnas capilares comerciales recubiertas de PDMS con diferentes porcentajes de grupos difenilo (TRB-5 y TRB-35) modificadas con c-CNTs. Estas columnas se han utilizado como fase de extracción para IT-SPME-CapLC-DAD. Los nanomateriales c-SWCNTs y c-MWCNTs fueron inmovilizados satisfactoriamente en las columnas comerciales TRB-5 y TRB-35. Se ha evaluado la capacidad de extracción de estas fases para compuestos heterocíclicos nitrogenados y PAHs.

Los resultados obtenidos indican que la capacidad de extracción de estas fases no depende tanto de la polaridad de los analitos ($\log K_{ow}$) como de los grupos funcionales de los analitos y el sorbente. Por ejemplo, la capacidad de extracción de los PAHs aumenta significativamente cuando se modifican las fases con c-CNTs, debido a las interacciones de tipo π - π . Los resultados indican que el porcentaje de grupos difenilo y el tipo de c-CNTs (c-SWCNTs y c-MWCNTs) también influyen en la capacidad de extracción.

Bajo las condiciones experimentales utilizadas, la mejor eficiencia en la extracción para los PAHs estudiados se ha conseguido con la fase c-SWCNTs-TRB-5. Esta fase también proporciona mejores resultados para algunas triazinas que la columna TRB-5 sin modificar. Por otro lado, la fase c-MWCNTs-TRB-35 es la más adecuada para la extracción del piriproxifeno. Sin embargo, para el análisis simultáneo de todos los compuestos estudiados la mejor opción sería la fase c-SWCNTs-TRB-5.

Por tanto, se corroboró que la estructura de los analitos y del material sorbente son variables fundamentales a tener en cuenta a la hora de seleccionar la fase de extracción para IT-SPME en este tipo de compuestos.

4.1.2. Fases sintetizadas

Como se ha mencionado con anterioridad, en la actualidad uno de los objetivos de la Química Analítica consiste en desarrollar procedimientos sostenibles que permitan la rápida determinación de contaminantes en concentraciones más bajas, incluyendo un creciente número de compuestos polares. Por ello es necesaria la búsqueda de nuevas fases de extracción que permitan retener y preconcentrar compuestos de mayor polaridad. En esta línea, se ha desarrollado una nueva fase de extracción para IT-SPME basada en el empleo de un polímero de TEOS-MTEOS como recubrimiento de las paredes internas de un capilar de sílice fundida. Con el fin de incrementar la capacidad de extracción del material sorbente, el polímero se dopó con NPs de SiO_2 y TiO_2 .

En los siguientes apartados se compara la capacidad de extracción de la fase polimérica propuesta con la capacidad de extracción obtenida utilizando diferentes columnas comerciales de GC. Para llevar a cabo este estudio se seleccionaron como analitos diversos contaminantes ambientales de distinta estructura y polaridad. Además, los procedimientos desarrollados se aplicaron tanto al análisis de muestras de agua como de suelos agrícolas.

Se han realizado dos estudios diferentes. En primer lugar, se comparó mediante IT-SPME-CapLC-DAD la capacidad de extracción y preconcentración de las fases comerciales y la fase polimérica desarrollada modificada con NPs de SiO_2 para el análisis de diferentes pesticidas. Seguidamente, se realizó el mismo estudio comparativo para la extracción y preconcentración de compuestos aromáticos como sacarina, naftaleno y fluoranteno. Este segundo estudio se realizó utilizando IT-SPME-CapLC-FD, e incluyendo además el polímero modificado con NPs de TiO_2 .

4.1.2.1 Estudio de la extracción en línea de contaminantes polares por IT-SPME empleando fases con nanopartículas de sílice

En este apartado se comentan los resultados obtenidos empleando como fase de extracción las columnas comerciales TRB-5, TRB-35, Carbowax y FFAP, así como las fases obtenidas con TEOS-MTEOS sin modificar y modificadas con NPs de SiO₂. Para realizar este estudio se han seleccionado diferentes pesticidas como compuestos representativos de analitos de media-alta polaridad. Los compuestos seleccionados fueron iodosulfurón-metil, tritosulfurón, tribenurón-metil, metribuzina, triflusal-sulfurón-metil, irgarol®-1051, bifenox y cipermetrina.

Estudio de las condiciones cromatográficas

Inicialmente se evaluaron los perfiles cromatográficos obtenidos con las diferentes fases de extracción estudiadas. No se observaron diferencias significativas ni en los tiempos de retención ni en el perfil de pico para ninguno de los analitos con las fases de extracción seleccionadas. Esto indica que, para todas ellas, la desorción y transferencia de los analitos de la columna de extracción a la columna analítica es muy rápida, y por tanto el acoplamiento de la técnica IT-SPME no causa picos adicionales ni distorsiona el perfil cromatográfico. Cabe mencionar que en las condiciones de elución seleccionadas (Tabla 15) se obtuvieron dos picos para la cipermetrina, atribuidos a diferentes isómeros de este compuesto. En ensayos cuantitativos se utilizó la suma de las áreas de ambos picos como la señal analítica para este pesticida.

Estudio de la eficiencia de extracción

Para poder comparar la eficiencia de extracción de las diferentes fases estudiadas se procesaron 100 µL de disolución patrón que contenía (200 µg L⁻¹) de cada uno de los analitos. La Figura 35 muestra las áreas de pico obtenidas para cada analito y fase de extracción.

Con la intención de evaluar si las áreas de pico obtenidas con la fase de extracción TEOS-MTEOS con NPs de SiO₂ inmovilizadas era significativamente diferente a las áreas de pico obtenidas con el resto de fases, se realizó para cada analito un test t de comparación de valores entre la señal obtenida con la fase propuesta y la máxima señal obtenida para el resto de columnas. Es decir, se comparó el área de pico obtenida con la fase TEOS-MTEOS-SiO₂ con el área obtenida con la fase FFAP para el iodosulfurón-metil, tritosulfurón, tribenurón-metil, triflurosulfurón-metil e irgarol®-1051, con la fase TEOS-MTEOS para la metribuzina y el bifenox, y con la fase TRB-5 para la cipermetrina (Figura 35). Los valores de $t_{calculada}$ fueron más altos que el valor de $t_{tabulada}$ para un nivel de confianza del 95 % excepto para el tribenurón-metil ($t_{calculada} = 1.485$, $t_{tabulada} = 2.365$). Esto indicó que la fase TEOS-MTEOS-SiO₂ proporcionaba una señal significativamente superior al resto de fases de extracción para todos los analitos, excepto para el tribenurón-metil.

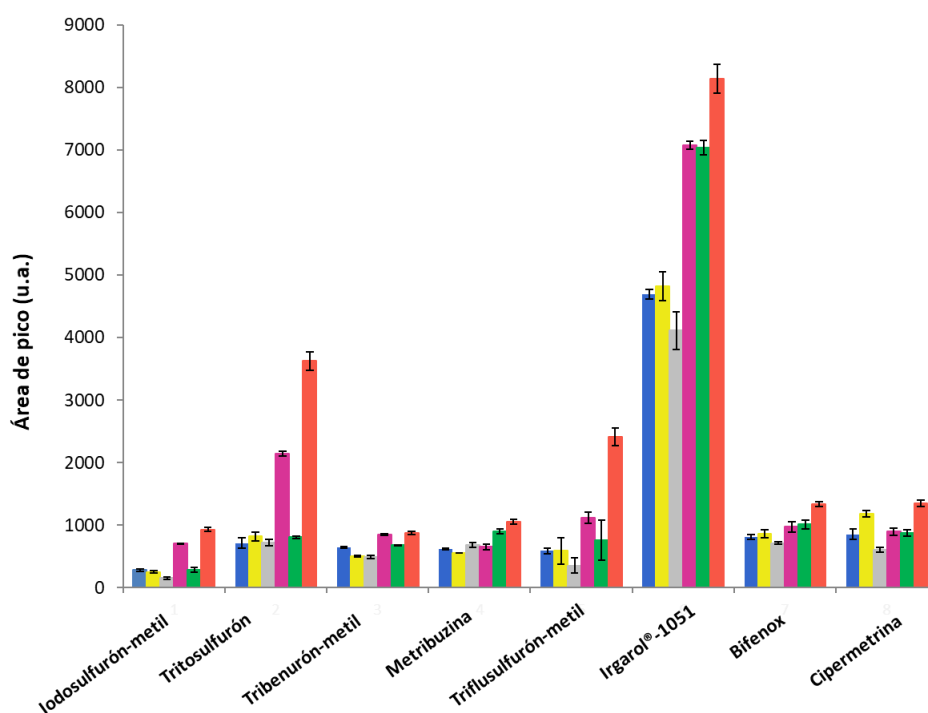


Figura 35. Áreas de pico obtenidas con los capilares TRB-5 (azul), TRB-35 (amarillo), Carbowax (gris), FFAP (morado), TEOS-MTEOS (verde) y TEOS-MTEOS-SiO₂ (rojo). Concentración de los analitos 200 µg mL⁻¹ n=3.

Asimismo, se calculó el IP para comparar la capacidad de extracción de las diferentes fases estudiadas. En este caso, el IP corresponde a la relación entre la señal analítica de cada analito obtenida con una determinada fase de extracción y la señal obtenida para el mismo analito con la fase TRB-5. Se decidió tomar la fase TRB-5 como referencia ya que ésta fase se había utilizado anteriormente en la determinación de herbicidas (ver sección 4.1.1.2). Los IP obtenidos se muestran en la Tabla 28.

Los valores de IPs obtenidos para cada analito pueden explicarse en base a las interacciones que se establecen en cada caso con el material sorbente. Por un lado, las columnas TRB-5 y TRB-35 poseen grupos difenilo que pueden interaccionar a través de interacciones de tipo π - π con los anillos aromáticos de los analitos (Tabla 8 y 11). Los IPs obtenidos para la columna TRB-35 son muy próximos a 1, lo que indica que no hay diferencias significativas entre la capacidad de extracción de la columna TRB-5 y TRB-35, es decir, al aumentar el porcentaje de grupos difenilo no aumenta la capacidad de extracción. Esto sugiere que con un 5 % de grupos difenilo en la fase de extracción se alcanza el número máximo de puntos de interacción con los anillos aromáticos de los analitos a la concentración de trabajo.

Tabla 27. *IPs calculados respecto a la fase TRB-5.*

Analito	TRB-35	PEG	FFAP	TEOS-MTEOS	TEOS-MTEOS-SiO ₂
Iodosulfurón-metil	0.90 ± 0.09	0.55 ± 0.08	2.5 ± 0.2	1.0 ± 0.1	3.3 ± 0.2
Tritosulfurón	1.1 ± 0.2	1.0 ± 0.1	3.0 ± 0.4	1.1 ± 0.1	5.1 ± 0.6
Tribenurón-metil	0.79 ± 0.03	0.77 ± 0.04	1.8 ± 0.1	1.06 ± 0.03	3.8 ± 0.1
Metribuzina	0.90 ± 0.02	1.10 ± 0.07	1.06 ± 0.07	1.46 ± 0.07	1.8 ± 0.1
Triflusulfurón-metil	1.0 ± 0.4	1.0 ± 0.2	1.9 ± 0.2	1.3 ± 0.6	4.1 ± 0.4
Irgarol®-1051	1.03 ± 0.05	1.08 ± 0.07	1.25 ± 0.03	1.50 ± 0.04	2.6 ± 0.1
Bifenox	1.1 ± 0.1	1.10 ± 0.05	1.3 ± 0.1	1.2 ± 0.1	2.1 ± 0.1
Cipermetrina	1.3 ± 0.2	0.65 ± 0.08	1.5 ± 0.1	1.4 ± 0.1	2.1 ± 0.2

Por otro lado, las fases basadas en PEG consisten en una red polimérica que contiene grupos hidroxilo, siendo una fase selectiva para la extracción de compuestos polares (Wang et al., 2000; Silva & Augusto, 2005). La mayoría de los contaminantes incluidos en este estudio tienen grupos funcionales ($-NH_2$, $-NH...$) que pueden interaccionar con los grupos hidroxilo de la fase de extracción. Por tanto, cabe esperar una alta capacidad de extracción. Sin embargo, los IPs obtenidos con la fase PEG (Tabla 28) son similares o en algunos casos menores a los obtenidos con las columnas de PDMS. Esto quizás se deba a que la presencia de grupos hidroxilo libres en la fase PEG no supera las interacciones π - π que se establecen en las fases de PDMS con grupos difenilo. Esta hipótesis está de acuerdo con los valores de IP obtenidos con la fase FFAP (PEG modificado con ácido nitrotereftálico). Como se observa en la Tabla 28, los IPs obtenidos para todos los analitos con la columna FFAP son mayores a 1, lo que indica una mayor interacción entre esta fase y los compuestos seleccionados a causa de la presencia en la fase de extracción de anillos aromáticos, grupos nitro y grupos carbonilo; estos últimos pueden interaccionar con los analitos a través de interacciones dipolo-dipolo y puente de hidrógeno.

Cuando se utilizó el capilar recubierto con fase sintetizada de TEOS-MTEOS, se observó un ligero incremento de la capacidad de extracción para todos los analitos respecto a la fase TRB-5. Este incremento fue mayor para la metribuzina y el irgarol®-1051, ya que poseen un grupo terc-butilo, y dado que las interacciones hidrofóbicas son las predominantes en este tipo de fases (Ou et al., 2013), la adsorción de estos dos compuestos está favorecida.

Por otro lado, la inmovilización de NPs de SiO_2 en la fase de TEOS-MTEOS produjo un incremento significativo de la señal para todos los analitos (Figura 36) y por tanto los factores de preconcentración son elevados, especialmente para los compuestos más polares (Tabla 28). Este incremento de la capacidad de extracción puede ser explicado por la presencia de grupos hidroxilo en la superficie de las NPs de SiO_2 (Patwardhan et al., 2012; Bapat, Labade, Chaudhari & Zinjarde, 2016), que permiten interacciones hidrofílicas como por ejemplo puentes de hidrógeno. Es decir, el incremento de la capacidad de extracción se debe a la combinación de las interacciones hidrofóbicas debidas a la red polimérica y a las interacciones hidrofílicas entre los analitos y los grupos $-OH$ de las NPs inmovilizadas.

De acuerdo con los valores obtenidos en la Tabla 28, se seleccionó el capilar recubierto de TEOS-MTEOS modificado con NPs de SiO₂ como fase de extracción óptima para la determinación de los contaminantes seleccionados. A modo de ejemplo, en la Figura 36 se muestran los cromatogramas obtenidos para disoluciones patrón de los analitos en las condiciones propuestas.

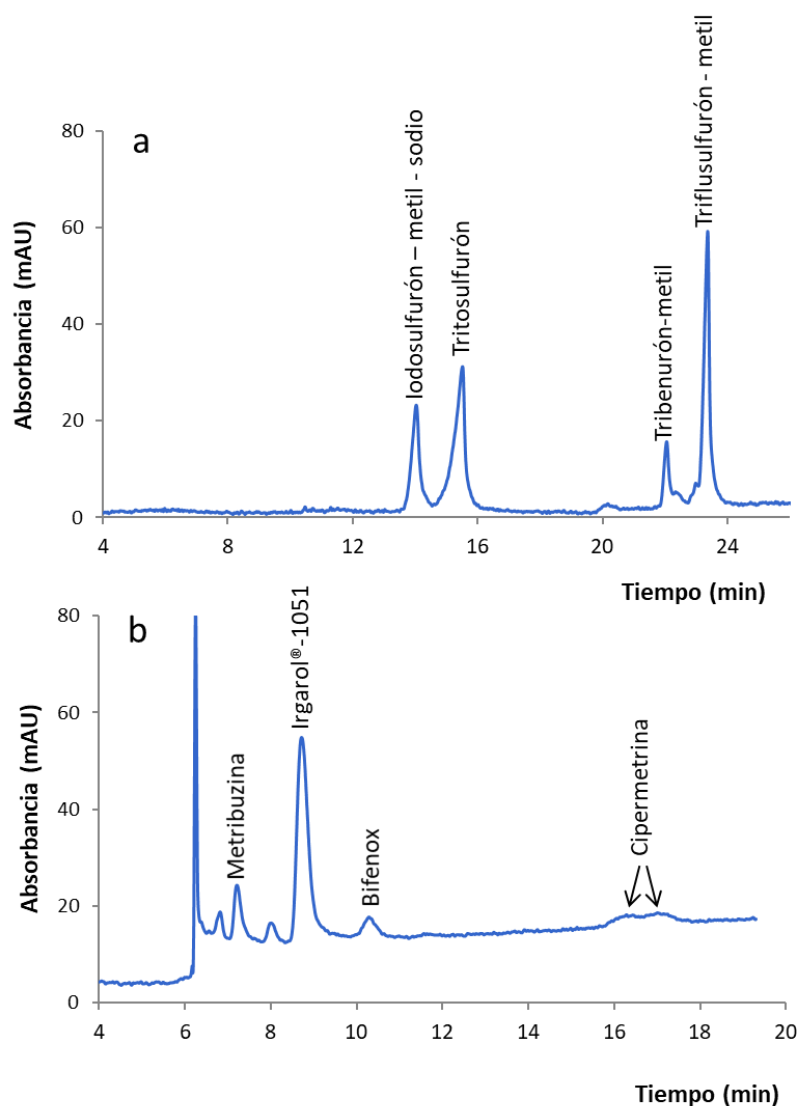


Figura 36. Cromatogramas obtenidos a 230 nm para disoluciones patrón de a) iodosulfurón-metil, tritosulfurón, tribenurón-metil y triflusulfurón-metil ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) y b) metribuzina, irgarol®-1051, bifenox y cipermetrina ($25 \mu\text{g L}^{-1}$)

Parámetros analíticos

En la Tabla 29 se muestran los parámetros analíticos obtenidos con la columna capilar recubierta de la fase TEOS-MTEOS modificada con NPs de SiO₂. Como se puede observar en esta tabla, se consiguió una linealidad satisfactoria en el intervalo 20-200 µg mL⁻¹ para la cipermetrina y de 5 a 200 µg L⁻¹ para el resto de analitos. Se observaron valores de RSD inferiores al 10 % (n = 3). Los LODs fueron inferiores a 1 µg L⁻¹, excepto para la cipermetrina debido a que se eluye como un doble pico. El LOD de la cipermetrina se estableció con el primer pico, ya que es el más intenso de los dos, pero el valor del LOD calculado corresponde a la concentración total de los isómeros.

Tabla 28. Parámetros analíticos obtenidos con la columna TEOS-MTEOS-SiO₂.

Analito	Recta calibrado ($y = a + bx$) ¹			Precisión ² (n =3) (%)	LODs µg L ⁻¹
	a ± s _a	b ± s _b	R ²		
Iodosulfurón-metil	-11 ± 2	3.7 ± 0.1	0.990	4	1.0
Tritosulfurón	2 ± 6	5.0 ± 0.2	0.991	2	1.0
Tribenurón-metil	-17 ± 11	6.1 ± 0.1	0.996	3	2.5
Metribuzina	22 ± 1	5.17 ± 0.01	0.9990	9	0.5
Triflusulfurón-metil	-19 ± 12	6.65 ± 0.10	0.995	3	0.75
Irgarol®-1051	-50 ± 30	40.9 ± 0.4	0.9995	1	0.5
Bifenox	-50 ± 40	6.9 ± 0.2	0.9998	5	1.0
Cipermetrina	12 ± 9	5.6 ± 0.2	0.9990	4	7.5

¹ Establecido con 5 concentraciones en el intervalo de 25 a 200 µg L⁻¹ de cipermetrina y 20 a 200 µg L⁻¹ para el resto de analitos. ² Para una concentración de 100 µg L⁻¹ de cipermetrina y 25 µg L⁻¹ del resto de analitos.

Aplicación al análisis de muestras ambientales

Finalmente, el procedimiento propuesto se aplicó al análisis de muestras de agua de mar y transición. Antes de ser procesadas por el sistema IT-SPME las muestras únicamente fueron filtradas.

Los compuestos de la matriz se eluían principalmente entre 2-6 min, por tanto, no interferían con los picos correspondientes a los analitos, cuyos tiempos de retención se encontraban en el intervalo de 7 a 25 min (Figura 37). Sin embargo, en las muestras se observó un pico al mismo tiempo de retención que el bifenox.

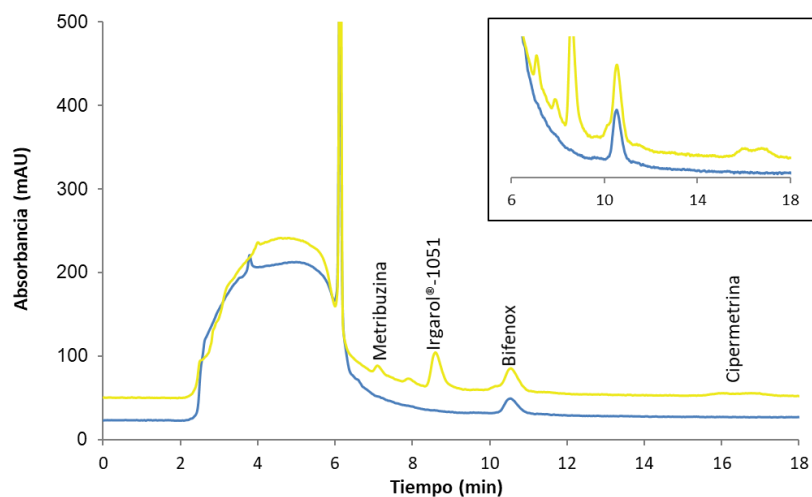


Figura 37. Cromatogramas obtenidos a 230 nm para una muestra de agua (azul) y la misma muestra fortificada (amarillo) con metribuzina, irgarol®-1051, bifenox ($25 \mu\text{g L}^{-1}$) y cipermetrina ($125 \mu\text{g L}^{-1}$).

Una de las muestras de agua fue fortificada con $25 \mu\text{g L}^{-1}$ de metribuzina e irgarol®-1051, $125 \mu\text{g L}^{-1}$ de cipermetrina y $200 \mu\text{g L}^{-1}$ del resto de pesticidas para evaluar la existencia de efecto matriz a través del cálculo de la recuperación. En la Figura 30 se muestran los cromatogramas obtenidos para la muestra de agua sin fortificar y fortificada. La recuperación para cada analito se calculó a partir de la relación entre el área de pico obtenida en la muestra fortificada y el área correspondiente a un patrón de la misma concentración. El bifenox no se incluyó en los estudios de recuperación por las razones mencionadas anteriormente.

Los valores de recuperación calculados se muestran en la Tabla 30. Como se puede observar, las recuperaciones obtenidas son próximas a 100 %, lo que indica que el análisis de este tipo de muestras empleando como fase de extracción la columna capilar de sílice recubierta del material polimérico de TEOS-MTEOS-SiO₂ no está afectado de efecto matriz. Cabe destacar que las muestras fueron procesadas sin ajustar ni el pH ni la fuerza iónica. Los resultados obtenidos indican que el efecto de ambas variables es poco significativo en la extracción de los analitos con la fase utilizada en el procedimiento propuesto.

Tabla 29. Recuperaciones obtenidas para una muestra de aguade mar.

Analito	Recuperación (n = 3) (%)
Iodosulfurón-metil	100 ± 2
Tritosulfurón	143 ± 3
Tribenurón-metil	109 ± 4
Metribuzina	84 ± 4
Triflusulfurón-metil	115 ± 6
Irgarol®-1051	100 ± 9
Cipermetrina	106 ± 6

Además, se realizó un estudio preliminar sobre extracción y determinación en suelos agrícolas de los pesticidas metribuzina, irgarol®-1051, bifeno x y cipermetrina. Para ello se adicionaron a una muestra de suelo agrícola, 40 ng g⁻¹ de cipermetrina y 25 ng g⁻¹ de metribuzina, irgarol®-1051 y bifeno x. La extracción se realizó con metanol en baño de ultrasonidos (Sección 3.3.1). En la Figura 38 se muestra el cromatograma obtenido para el extracto de suelo sin fortificar y fortificado. Aunque el perfil cromatográfico es adecuado, las recuperaciones observadas fueron inferiores a las obtenidas para las muestras de agua (< 65 %). Probablemente, el porcentaje de recuperación podría incrementarse optimizando el procedimiento de extracción.

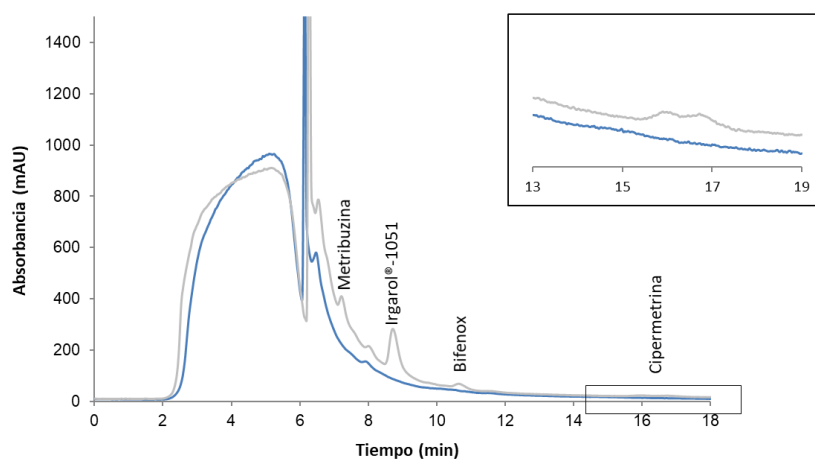


Figura 38. Cromatogramas obtenidos a 230 nm para un extracto de una muestra de suelo (azul) y la misma muestra fortificada (rojo) con metribuzina, irgarol®-1051, bifeno x (25 ng g⁻¹) y cipermetrina (125 ng g⁻¹).

Conclusiones

En este estudio se ha comparado la capacidad de extracción de diferentes fases de extracción para la determinación de diversos contaminantes ambientales por IT-SPME-CapLC-DAD. Los resultados obtenidos indican que en general para las columnas comerciales TRB-5, TRB-35, PEG y FFAP no existen diferencias significativas en la capacidad de extracción de los compuestos seleccionados, si bien para algunos analitos la capacidad de extracción de la última fase era ligeramente superior. Por otro lado, se ha incluido en el estudio una fase polimérica sintetizada en el laboratorio (TEOS-MTEOS); aunque su capacidad de extracción no es muy superior a las fases comerciales, al inmovilizar NPs de SiO₂ en la fase polimérica, la capacidad de extracción aumentaba significativamente para todo los analitos. Este aumento se debe a las nuevas interacciones que se establecen entre los analitos y los grupos hidroxilo de las NPs.

Finalmente, se ha propuesto un procedimiento para la determinación de diferentes pesticidas por IT-SPME-CapLC-DAD empleando la fase desarrollada de TEOS-MTEOS modificada con NPs de SiO₂. Los parámetros analíticos obtenidos son satisfactorios para el análisis de muestras de agua de mar, agua de transición y suelos. No obstante, para las muestras de suelo sería necesario realizar un estudio más exhaustivo para optimizar el procedimiento de extracción previo a la etapa de IT-SPME.

4.1.2.2. Estudio de la capacidad de extracción de la fase TEOS-MTEOS con NPs de SiO₂ y TiO₂ para la determinación de compuestos aromáticos

A continuación se realizó un estudio comparativo de la capacidad de extracción de las columnas capilares de GC comerciales y las columnas capilares sintéticas recubiertas de TEOS-MTEOS con NPs de SiO₂ y TiO₂ para la extracción y preconcentración de compuestos aromáticos empleando IT-SPME acoplada a CapLC con detector de fluorescencia. Como analitos se seleccionaron la sacarina, el naftaleno y el fluoranteno, compuestos aromáticos con diferente número de anillos aromáticos (1, 2 y 4, respectivamente) y polaridad (log Kow = 0.45, 3.3 y 5.2).

A pesar de que en el mercado existen gran variedad de columnas capilares recubiertas con materiales sorbentes de diferente naturaleza y compatibles con CapLC, en este estudio comparativo se seleccionaron columnas de extracción recubiertas por un sorbente con grupos difenilo, ya que cabe esperar que estas fases retengan fuertemente los compuestos aromáticos por interacciones de tipo π - π . Concretamente, se utilizaron capilares recubiertos de PDMS modificado con grupos difenilo (TRB-35), PEG modificado con ácido nitrotereftálico (FFAP) y poliestireno-divinilbenceno (PS-DVB). Previamente al estudio de la capacidad de extracción de las diferentes fases, se optimizaron las condiciones cromatográficas.

Optimización de las condiciones cromatográficas

Los resultados preliminares pusieron de manifiesto que, además del tiempo de retención y la forma del pico, la eficiencia de la extracción (evaluada como área de pico) también depende de la composición de la fase móvil. Por ello esta variable debe ser optimizada. Por ejemplo, cuando se utilizó agua como fase móvil, la sacarina se desorbió rápidamente de todas las columnas de extracción ensayadas debido a su elevada polaridad (log Kow = 0.45). Sin embargo, cuando la fase móvil contenía un elevado porcentaje de agua, la desorción del fluoranteno (el compuesto más apolar de los tres) requirió de elevados tiempos de desorción (> 5 min), obteniéndose picos cromatográficos muy anchos a causa de su difusión dentro del sistema; esto ocurrió de forma más acentuada cuando se utilizó el capilar PS-DVB para la extracción.

Con el fin de reducir la influencia de la fase móvil y estudiar la eficiencia de la extracción independientemente de la separación cromatográfica, se eliminó la columna analítica del sistema cromatográfico, conectando la válvula de inyección directamente al detector de fluorescencia. Para la elución de los analitos se seleccionó como fase móvil una mezcla de acetonitrilo y agua al 50 %, excepto para la elución de la sacarina, para la cual se empleó una fase móvil con un 100 % de agua, así como para la elución del fluoranteno del capilar PS-DVB, que se empleó 100 % acetonitrilo como fase móvil.

Estudio de la eficiencia de extracción

Una vez establecidas las condiciones de elución, se estudió la eficiencia de extracción para las diferentes fases, tanto comerciales como las de TEOS-MTEOS dopadas con NPs. Para ello se procesaron volúmenes crecientes de disoluciones patrón de cada uno de los analitos (50 - 400 μL) en las condiciones indicadas anteriormente. El estudio de la eficiencia de extracción de los diferentes capilares ensayados se llevó a cabo mediante la comparación de las áreas de pico obtenidas para cada analito con cada una de las columnas de extracción (Argente-García et al., 2016).

Como se puede observar en la Figura 39, los resultados obtenidos para la sacarina son significativamente diferentes a los obtenidos para el naftaleno y el fluoranteno. Con todas las fases de extracción estudiadas se observó un aumento del área de pico de la sacarina cuando el volumen de muestra procesado se incrementó de 50 μL a 100 μL . Sin embargo, cuando se procesaron volúmenes superiores a 100 μL no se observó un aumento de la señal. Por el contrario, las áreas de pico para el naftaleno y el fluoranteno aumentaron a medida que aumentaba el volumen de muestra procesado (Figura 39). Para estos últimos compuestos, el incremento de señal respecto al volumen de muestra procesado era más significativo con los capilares que proporcionaron mayor señal analítica (PS-DVB y TEOS-MTEOS-SiO₂), observándose una relación lineal entre la señal y el volumen de muestra procesado. Para el resto de fases, el incremento resultó ser moderado.

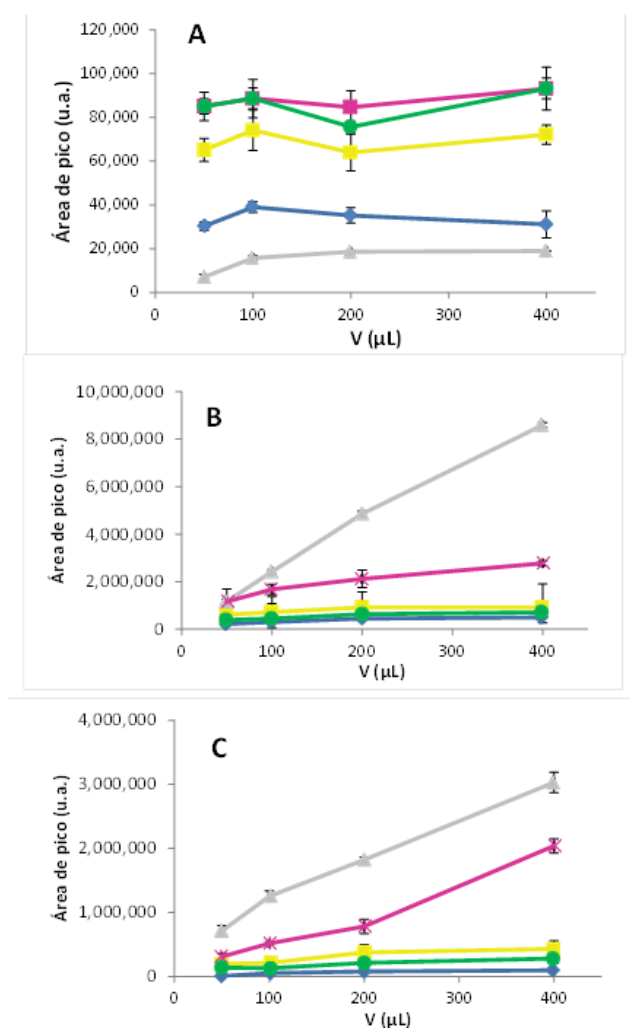


Figura 39. Efecto del volumen de muestra en la señal analítica obtenida al procesar A) sacarina ($125 \mu\text{L mL}^{-1}$), B) naftaleno ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) y C) fluoranteno ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) empleando los capilares TRB-35 (azul), FFAP (amarillo), PS-DVB (gris), TEOS-MTEOS (morado) y TEOS-MTEOS-SiO₂ (verde) $n=3$.

Para un volumen de muestra determinado, se observaron mayores áreas de pico para la sacarina cuando la extracción se llevó a cabo empleando los capilares de TEOS-MTEOS con NPs de SiO₂ y TiO₂ como fase de extracción. Cabe destacar que no existen diferencias significativas entre las áreas de pico obtenidas con el polímero de TEOS-MTEOS modificado con NPs de SiO₂ y con NPs de TiO₂. Estos resultados sugieren que las interacciones de tipo puente de hidrógeno y dipolo-dipolo que se pueden establecer entre las NPs y los grupos amino de la sacarina son los mecanismos de interacción predominantes entre la fase extractiva y las moléculas de analito. Entre las fases comerciales, la fase FFAP presentaba mayor capacidad de extracción para la sacarina. Esto puede ser explicado por las interacciones electroestáticas que pueden establecerse entre los grupos amino de la sacarina y los grupos nitro del material sorbente, con carga negativa en los átomos de oxígeno y positiva en los átomos de nitrógeno.

Respecto al naftaleno y al fluoranteno, es de esperar que ambos compuestos interaccionen preferentemente con la fase TEOS-MTEOS a través de interacciones hidrofóbicas, y de tipo π - π con las fases comerciales TRB-35, FFAP y PS-DVB. Como se puede observar en la Figura 39, la eficiencia de extracción de la fase PS-DVB es superior a la obtenida con las otras fases comerciales, debido probablemente a la diferencia en el espesor de la capa del material sorbente, la cual era mayor en la fase de PS-DVB. De hecho, incluso la fase TEOS-MTEOS modificada con NPs de SiO₂ presentaba mayor capacidad de extracción que los capilares TRB-35 y FFAP, resultados poco previsibles ya que ambas fases comerciales pueden establecer interacciones de tipo π - π con los analitos, quedando éstos fuertemente retenidos.

Dado el carácter hidrofóbico del naftaleno y el fluoranteno y que las NPs principalmente establecen interacciones de tipo hidrofílico, cabría esperar que las fases de TEOS-MTEOS presentaran la misma capacidad de extracción para ambos compuestos aromáticos, independientemente del tipo de NPs inmovilizadas, ya que el mecanismo de retención se establecería entre las cadenas hidrofóbicas del polímero y los analitos. Sin embargo, los resultados obtenidos muestran que la capacidad de extracción de la fase de TEOS-MTEOS-SiO₂ es superior a la obtenida cuando se utiliza la fase TEOS-MTEOS-TiO₂. Esta diferencia puede ser explicada si se atiende a la morfología del sorbente lo que indicaría que al añadir NPs de SiO₂ a la mezcla de monómeros, el polímero resultante posee mayor área superficial que cuando se utilizan NPs de TiO₂. Al poseer el material sorbente mayor área superficial, el número de sitios específicos para interaccionar con los analitos es mayor y, por tanto, se retiene más cantidad de estos.

Precisión y selectividad

Para el estudio de la precisión se procesaron ya con el sistema completo (incluyendo la columna analítica), tres réplicas consecutivas de 200 µL de disolución patrón de los compuestos estudiados. A modo de ejemplo, en la Figura 40A, se muestran los cromatogramas obtenidos para el naftaleno y el fluoranteno. Las RSDs obtenidas para las columnas de TEOS-MTEOS con NPs y las columnas capilares comerciales estudiadas se muestran en la Tabla 31. Estos resultados indican que la precisión obtenida con las columnas de extracción sintetizadas fue adecuada (RSD < 10 %) y comparable a la obtenida con las columnas comerciales. No se encontraron diferencias significativas en la precisión para las dos fases propuestas de TEOS-MTEOS modificadas con NPs.

Tabla 30. Precisión obtenida empleando capilares recubiertos de TEOS-MTEOS funcionalizados con NPs de SiO₂ y TiO₂ y el capilar comercial que mejor factor de extracción proporciona para cada compuesto (n=3); volumen de muestra 200 µL.

Compuesto	Concentración (µg mL ⁻¹)	Fase extracción	RSD (%)
Sacarina	125	TEOS-MTEOS-SiO ₂	6
		TEOS-MTEOS-TiO ₂	4
		FFAP	9
Naftaleno	20.0	TEOS-MTEOS-SiO ₂	4
		TEOS-MTEOS-TiO ₂	9
		PS-DVB	8
Fluoranteno	1.0	TEOS-MTEOS-SiO ₂	4
		TEOS-MTEOS-TiO ₂	7
		PS-DVB	2

La selectividad fue evaluada para dos matrices de interés en el campo del análisis medioambiental, a fin de investigar si alguno de los componentes de la matriz podía interferir en la identificación o cuantificación de los analitos. Concretamente, las muestras estudiadas fueron agua de río y de acequia, y extractos de suelo agrícola. Este estudio se ha realizado para el naftaleno y el fluoranteno. Para la extracción de los analitos de la muestra sólida se trató una porción de suelo con acetona en baño de ultrasonidos. Seguidamente se evaporó el extracto y se reconstituyó con agua. Al igual que las muestras de agua, la disolución del extracto reconstituido se filtró, y se procesaron 200 µL por el sistema IT-SPME-CapLC, empleando la columna capilar PS-DVB como fase de extracción. En la Figura 40B, se muestran los cromatogramas obtenidos para algunas de las muestras ensayadas.

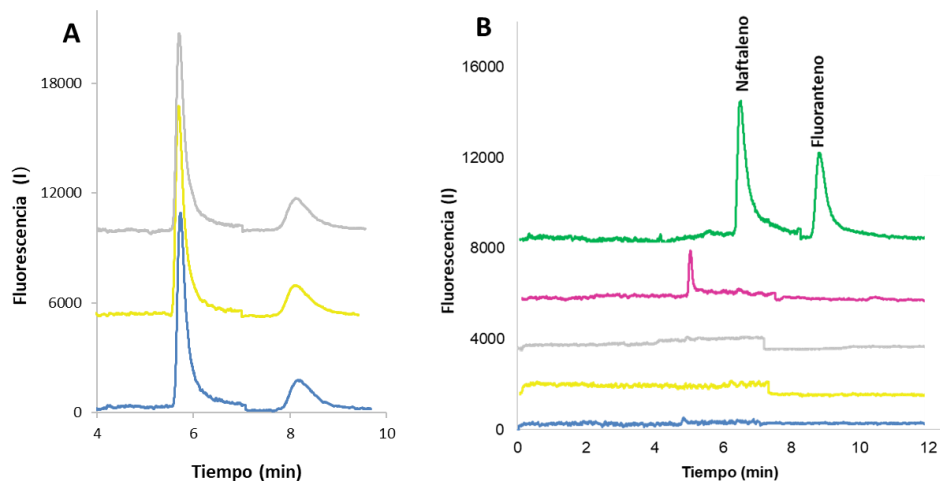


Figura 40. Cromatogramas obtenidos para: A) tres inyecciones sucesivas de de una disolución estandar de $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de naftaleno y $0.18 \mu\text{g mL}^{-1}$ de fluoranteno; B) muestra de agua nanopura (azul), agua de de acequia (amarillo), agua de río (gris), suelo (morado) y suelo fortificado con naftaleno y fluoranteno (verde). Volumen de muestra $200 \mu\text{L}$.

Como se observa en la Figura 40B, no existen diferencias significativas entre los registros obtenidos al procesar agua nanopura y las muestras de agua reales. Por tanto, la selectividad para este tipo de muestras se puede considerar satisfactoria. Por otro lado, en el registro correspondiente a un extracto de suelo se observó un pequeño pico, cuya área es mucho menor en el registro correspondiente a la misma muestra fortificada. Estas diferencias probablemente se puedan minimizar reduciendo el tamaño de partícula de la muestra. No obstante, el tiempo de retención de este pico no coincidía con el tiempo de elución de los analitos, por tanto se concluyó que la selectividad para los extractos de suelo también era adecuada.

Conclusiones

En este apartado se ha comparado la capacidad de extracción de diferentes columnas capilares comerciales (TRB-35, FFAP y PD-DVB) y dos columnas capilares recubiertas con un material polimérico modificado con NPs, usando diferentes contaminantes ambientales que contienen anillos aromáticos en su estructura. Para el compuesto más polar, la sacarina, la capacidad de extracción del capilar recubierto con TEOS-MTEOS y modificado con NPs es superior a la obtenida con las fases comerciales, sin observarse diferencias significativas entre el tipo de NPs utilizado. Esto puede ser debido a que además de las interacciones hidrofóbicas, el analito puede establecer con el sorbente interacciones de tipo electroestáticas y puentes de hidrógeno que no tienen lugar con los sorbentes comerciales estudiados.

Para el análisis de naftaleno y fluoranteno, el capilar PS-DVB es el que mayor capacidad de extracción mostró, siendo necesario un elevado porcentaje de acetonitrilo para la completa y rápida desorción de los analitos. Además, la selectividad es adecuada para la identificación y cuantificación de ambos compuestos en muestras ambientales de agua y suelo. No obstante, es necesario ampliar el estudio y optimizar las condiciones con el fin de validar el procedimiento. En este sentido, la sensibilidad del procedimiento podría incrementarse procesando mayores volúmenes de muestra (Figura 39).

En resumen, la fase de extracción TEOS-MTEOS-SiO₂ es una buena alternativa a las fases de extracción comerciales siendo de gran interés para la extracción de compuestos muy polares, especialmente si contienen grupos funcionales capaces de establecer interacciones tipo dipolo-dipolo y puentes de hidrógeno.

4.2 IT-SPME ACOPLADA A NANOCROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS

En la sección anterior se han mostrado y discutido los resultados obtenidos en el estudio con IT-SPME acoplada a CapLC empleando diferentes fases comerciales sin modificar y modificadas con c-CNTs, así como nuevas fases basadas en un polímero de silicio modificado con NPs de SiO₂ y TiO₂.

En las siguientes secciones se comentan los resultados obtenidos al acoplar la IT-SPME a NanoLC. El acoplamiento de ambas técnicas se ha realizado bajo la modalidad en válvula, empleando dos configuraciones diferentes. La primera de ellas es idéntica a la empleada en los estudios de IT-SPME acoplada a CapLC, con la única diferencia de que las conexiones internas de la válvula de inyección manual tienen menor volumen interno que las de la válvula utilizada para el acoplamiento con CapLC. Esta configuración, es la utilizada en la Sección 4.2.1 para estudiar la influencia de las dimensiones del sistema cromatográfico en la extracción de diferentes triazinas.

La otra configuración requiere mayor instrumentación, concretamente una válvula de inyección automática de 10 puertos y una bomba capilar adicional. Esta configuración se ha utilizado para acoplar en línea dos capilares a fin de incrementar la sensibilidad del análisis.

Adicionalmente, dada la escasa variedad de columnas de extracción compatibles con IT-SPME-NanoLC disponibles en el mercado, se han desarrollado nuevas fases para mejorar la extracción y preconcentración de compuestos polares presentes en matrices acuosas. En la Sección 4.2.2 se describen las diferentes fases desarrolladas, se muestran los resultados obtenidos en su caracterización, y se discuten los resultados obtenidos en su aplicación al análisis de contaminantes ambientales de carácter polar.

4.2.1 Configuraciones

En la presente tesis se han utilizado dos configuraciones diferentes de IT-SPME en válvula acoplada a NanoLC. En la Sección 3.3 se describen con detalle ambas configuraciones, así como el instrumental requerido en cada caso. La configuración más sencilla únicamente requiere una válvula de 6 vías y dos posiciones, en la que el loop de inyección se sustituye por la columna capilar que contiene la fase de extracción. Esta configuración se ha utilizado tanto para acoplar la IT-SPME a CapLC (Sección 4.1) como a NanoLC, permitiendo que ambos sistemas cromatográficos puedan ser comparados.

Cabe recordar que, como ya se ha mencionado anteriormente, ambas técnicas de cromatografía miniaturizada poseen el mismo fundamento, pero las dimensiones y características del sistema son diferentes. Por ello, las dimensiones del sistema IT-SPME (d.i. y longitud del capilar extractivo) deben adaptarse al sistema cromatográfico que se quiere utilizar. La Figura 41 muestra las dimensiones óptimas de IT-SPME acoplada a CapLC y NanoLC. Como se puede observar en dicha figura, los diámetros internos de las conexiones del sistema cromatográfico, del capilar de extracción y de la columna analítica son más pequeños para NanoLC que para CapLC en los sistemas utilizados. El volumen total del sistema IT-SPME-CapLC es aproximadamente de 62.4 μL , y menor de 2 μL para el sistema de IT-SPME-NanoLC.

Por otro lado, los parámetros operativos utilizados en ambos sistemas se muestran en la Tabla 31. Cabe destacar que el volumen de muestra y de lavado es menor para el sistema NanoLC, ya que el volumen interno del capilar de extracción es mucho más pequeño (Figura 41), por lo que si se procesan volúmenes relativamente elevados se produce la autoelución de los analitos.

Tabla 31. Parámetros operativos para los sistemas IT-SPME-NanoLC y IT-SPME-CapLC.

	IT-SPME-NanoLC	IT-SPME-CapLC
Flujo ($\mu\text{L min}^{-1}$)	0.7	5
Fase móvil (ACN:H ₂ O)	30:70	30:70
Volumen de muestra (mL)	0.5	4
Volumen de lavado (μL)	10	100
d.i. capilar extracción (μm)	0.1	0.32
Longitud capilar (mm)	150	400
Velocidad inyección (mL min^{-1})	2	7.5

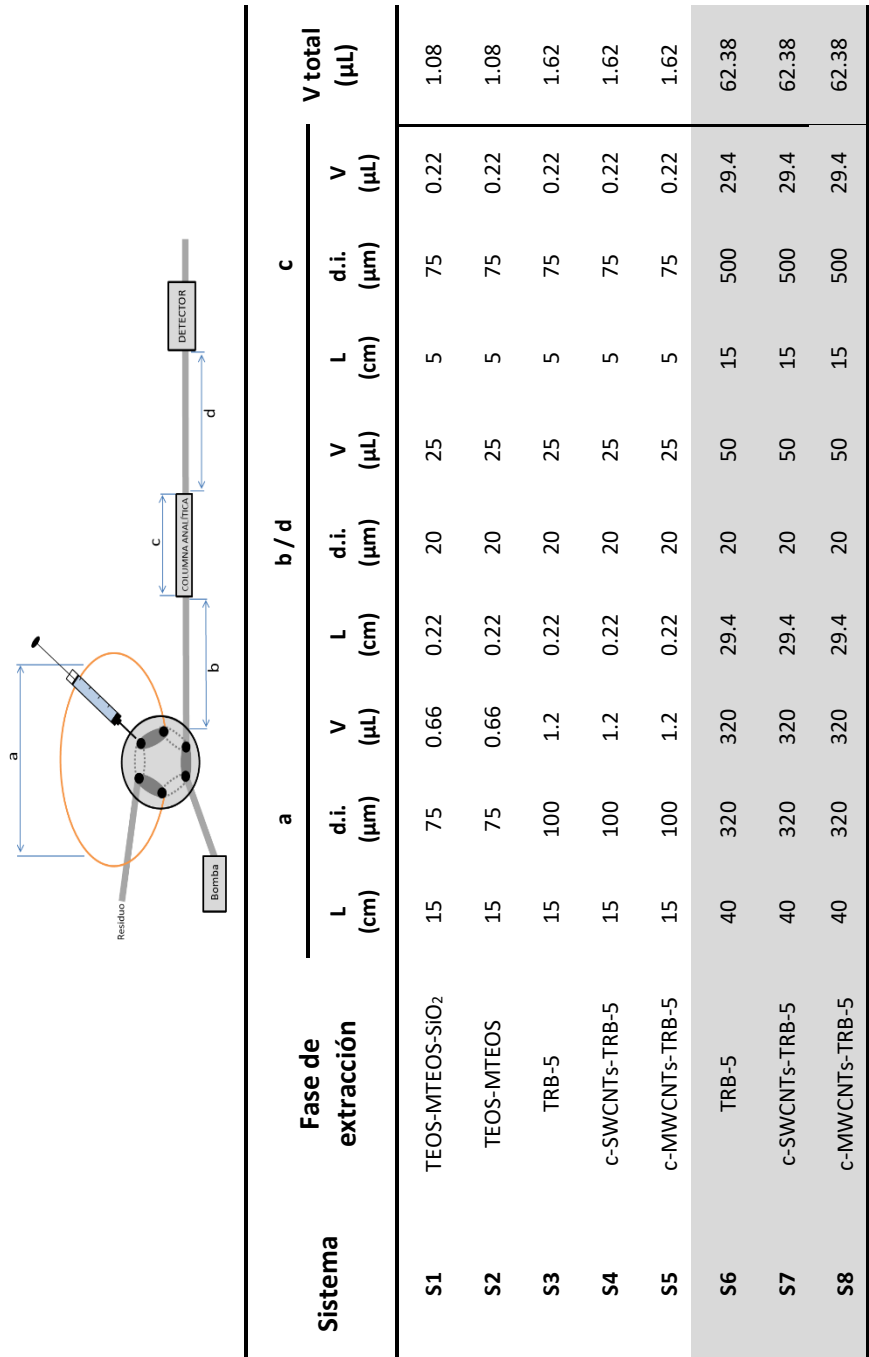


Figura 41. Fases y dimensiones de las configuraciones de IT-SPME utilizadas en esta tesis. En sombreado las configuraciones de NanoL.C.

Una vez estudiados y comparados los diferentes parámetros operativos de ambos sistemas, se estudió la capacidad de extracción comparando las respuestas obtenidas empleando un capilar de extracción recubierto con el mismo material sorbente, pero con las dimensiones adecuadas en cada caso. Concretamente, el estudio comparativo se llevó a cabo empleando columnas capilares de TRB-5, c-SWCNTs-TRB-5 y c-MWCNTs-TRB-5 de 100 μm de d.i. para IT-SPME-NanoLC, y 320 μm de d.i. para IT-SPME-CapLC.

Dado que el volumen de muestra que se analizó por ambos sistemas era diferente, se comparó la señal obtenida (área de pico) al procesar por el sistema de IT-SPME el volumen óptimo de una disolución de mezcla de triazinas para que la cantidad total de analito introducido fuera 1 ng.

La Figura 42 muestra la respuesta analítica obtenida para los analitos seleccionados con cada uno de los sistemas y diferentes fases de extracción. Como se puede observar, independientemente de la fase de extracción, el sistema de NanoLC proporciona mayor sensibilidad para todos los analitos, siendo la señal obtenida entre 10 y 25 veces mayor que la obtenida con CapLC. Estos resultados están de acuerdo con los descritos en bibliografía, y puede explicarse por el hecho de que la sensibilidad aumenta al disminuir el d.i. de las conexiones y la columna analítica del sistema cromatográfico (Nazario et al., 2015).

La mayor eficiencia de extracción para ambos sistemas se obtuvo con la fase c-SWCNTs-TRB-5, ya que se establecen interacciones de tipo π - π , intercambio iónico y puentes de hidrógeno entre los analitos y la fase de extracción. Los resultados obtenidos eran coherentes con los obtenidos en estudios previos (Sección 4.1.1.3). La fase TRB-35 solo pudo ser utilizada en IT-SPME-CapLC, ya que esta fase no se comercializa con una dimensión adecuada para NanoLC. Sin embargo, como se puede ver en la Figura 42, la fase TRB-35 proporcionó una sensibilidad similar a la obtenida con la fase c-SWCNTs-TRB-5, confirmando una vez más los resultados obtenidos en estudios anteriores.

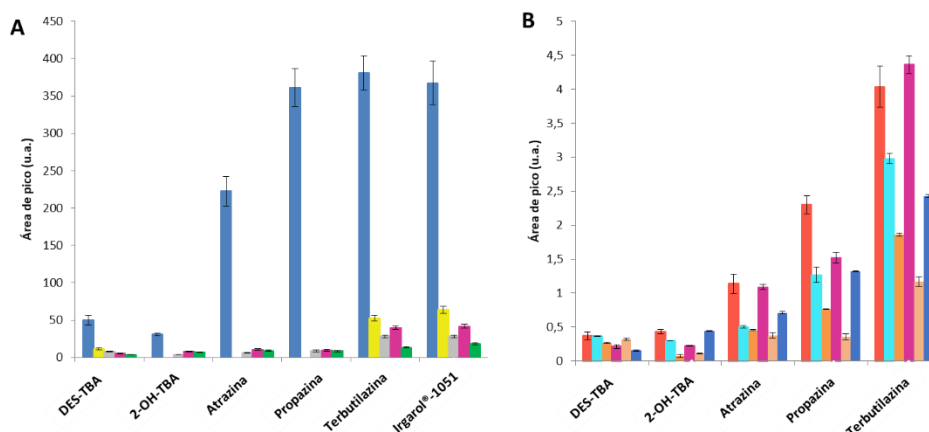


Figura 42. Señal analítica obtenida al procesar 1 ng de triazina por el sistema IT-SPME acoplado a A) NanoLC; B) CapLC, usando como fase de extracción los capilares TEOS-MTEOS-SiO₂ (azul), TEOS-MTEOS (amarillo), TRB-5 (gris), c-SWCNTs-TRB-5 (morado), c-MWCNTs-TRB-5 (verde), TRB-35 (rojo), c-SWCNTs-TRB-35 (turquesa) y c-MWCNTs-TRB-35 (naranja) $n=3$.

La otra configuración utilizada para acoplar IT-SPME a NanoLC es más compleja. Esta configuración se plantea por la necesidad de aumentar la sensibilidad del procedimiento acoplando en serie dos capilares de extracción recubiertos cada uno con diferente material sorbente. Concretamente, se acoplaron en serie un capilar de TEOS-METOS dopado con NPs de TiO₂ y otro con NPs de CuO. Estos capilares se instalaron en una válvula automática de 10 puertos que se encontraba conectada al equipo de NanoLC y a otra válvula de inyección manual de 6 puertos. En esta segunda válvula se conectó un loop PEEK de 500 μ L de volumen interno y a una bomba capilar. Para procesar la muestra, se llenaba el tubo PEEK con la válvula en posición de carga. Al cambiar a la posición de inyección, la bomba capilar la transfería hasta la válvula de 10 puertos haciéndola circular por ambas columnas de extracción; transcurrido el tiempo de transferencia, los analitos eran desorbidos por la fase móvil del sistema de NanoLC al cambiar de posición la válvula de 10 puertos.

En esta configuración es importante optimizar el tiempo de transferencia, es decir, el tiempo que debe transcurrir desde que se gira la válvula manual a la posición de inyección hasta que se gira la válvula automática a la posición de inyección. Durante este tiempo, la bomba capilar hace circular la disolución de los analitos por los capilares de extracción para su retención. Si el tiempo de transferencia no es suficiente no se consigue alcanzar la máxima capacidad de extracción, ya que no todo el volumen de muestra pasa por los capilares extractivos. Sin embargo, si el tiempo de transferencia es demasiado grande, la fase móvil de la bomba capilar termina desorbiendo los analitos obteniéndose peores factores de extracción. Con la bomba capilar trabajando a un flujo de $50 \mu\text{L min}^{-1}$, el tiempo óptimo de transferencia resultó ser 4 min para la mayoría de los compuestos. Sin embargo, cuando el flujo se redujo a $25 \mu\text{L min}^{-1}$ se requirieron 8 min de transferencia para obtener resultados similares por lo que se descartó esta opción. Finalmente, se estudió el orden en que son conectados los capilares a la columna de separación. Los resultados obtenidos mostraron que no había diferencias significativas en las áreas de pico de los analitos al intercambiar la posición de los capilares.

4.2.2 Estudio de nuevas fases

Uno de los objetivos fijados para esta tesis fue el desarrollo de nuevas fases de extracción. Este objetivo cobra especial relevancia cuando el sistema de IT-SPME se acopla a NanoLC, ya que en el mercado existen pocas columnas de GC que sean compatibles con las dimensiones requeridas.

En la presente tesis se han desarrollado diferentes fases de extracción compatibles con IT-SPME-NanoLC. Por una parte, se ha empleado como sorbente la fase de TEOS-MTEOS modificada con NPs de SiO_2 y TiO_2 para la extracción de pesticidas polares. Además, este polímero se ha modificado con otros tipos de NPs para incrementar el rendimiento de la extracción. De las diferentes fases desarrolladas, la fase de TEOS-MTEOS modificada con NPs de CuO proporcionó mayor eficiencia de extracción para compuestos altamente polares. Por ello, se ha acoplado en serie un capilar recubierto de TEOS-MTEOS modificado con NPs de CuO con otro capilar de la misma naturaleza, pero modificado con NPs de TiO_2 , para la determinación de tribenurón-metil y sus principales productos de degradación. Con este procedimiento se ha estudiado la degradación de este pesticida en diferentes condiciones ambientales.

Por otro lado, dado que la fase modificada con NPs de CuO proporciona mejores resultados para los compuestos más polares, se ha estudiado la posibilidad de emplear este capilar como fase de extracción para la determinación de triptófano y tirosina mediante IT-SPME-NanoLC, trabajando en modo HILIC para la elución de los analitos. El método propuesto se ha aplicado al estudio de la hidrólisis de la ovoalbúmina.

Finalmente, se ha desarrollado una fase de extracción monolítica de un polímero orgánico que contiene grupos borato. Con estos grupos se pretende incrementar la capacidad extractante y mejorar así la sensibilidad y selectividad en su aplicación.

4.2.2.1 IT-SPME-NanoLC: aplicación a la determinación de triazinas polares intactas y degradadas en muestras de agua y de estruvita recuperada

En primer lugar se ha adaptado la fase de extracción de TEOS-MTEOS modificada con NPs de SiO₂ desarrollada para CapLC a un sistema de IT-SPME acoplado a NanoLC. Para ello se ha sintetizado el material polimérico en un capilar de sílice de menor d.i. (75 µm). Esta fase de extracción se ha empleado satisfactoriamente en la determinación de triazinas y productos de degradación en muestras de agua, y en estruvita recuperada en plantas de depuración.

Estudio de la fase TEOS-MTEOS acoplada en NanoLC

En primer lugar se ha realizado un estudio comparativo entre la fase de TEOS-MTEOS modificada con NPs de SiO₂ y una de las pocas columnas de GC comerciales compatibles con NanoLC (TRB-5). En la Figura 43 se muestran los cromatogramas obtenidos mediante IT-SPME-NanoLC utilizando como fase de extracción las fases TEOS-MTEOS, TEOS-MTEOS-SiO₂ y TRB-5, para el análisis de una disolución patrón mezcla de desetil-terbutilazina, terbutilazina e Irgarol®-1051. Esta figura muestra que la señal obtenida con la fase TEOS-MTEOS-SiO₂ es mucho mayor que la obtenida con las otras dos fases. La fase desarrollada proporciona mayores áreas de pico para todas las triazinas estudiadas (Figura 43). Por tanto, se trata de una fase más adecuada para la extracción de compuestos polares.

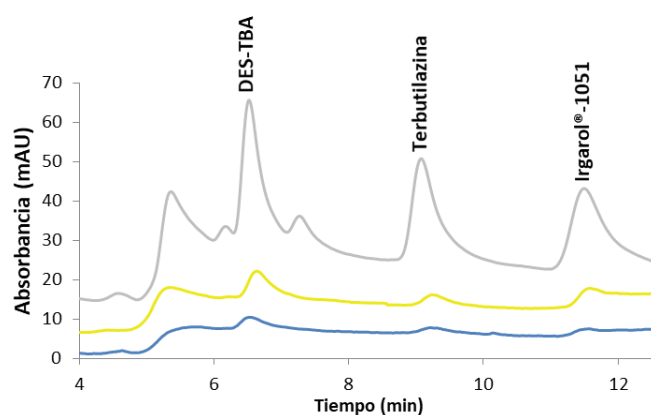


Figura 43. Cromatogramas obtenidos a 230 nm con las fases TEOS-MTEOS-SiO₂ (gris), TEOS-MTEOS (amarillo) y TRB-5 (azul).

Al utilizar como sorbente el polímero de TEOS-MTEOS sin modificar, la señal analítica se incrementó respecto a la columna comercial TRB-5 por un factor 1.2, 2.0 y 2.6 para desetil-terbutilazina, terbutilazina e irgarol®-1051, respectivamente. En el caso de la fase con NPs, el incremento fue de 4.5, 7.2 y 5.8. Como se ha mencionado anteriormente, el incremento de la señal al utilizar la fase con NPs de SiO₂ se debe a las interacciones entre los grupos hidroxilo de las NPs y los analitos (Patwardhan et al., 2012; Bapat et al., 2016). La adición de NPs también produce una alteración de la morfología del polímero, aumentando la porosidad de éste e incrementando su área superficial, de manera que se facilitan las interacciones entre analito y fase de extracción (Ensie & Samad, 2014).

Con el fin de evaluar el cambio en la porosidad, se tomaron microfotografías SEM de las fases de extracción preparadas. En la Figura 44 se muestran algunas de las imágenes obtenidas para el capilar recubierto con la fase TEOS-MTEOS (Figura 44 a y b) y con la fase TEOS-MTEOS-SiO₂ (Figura 44c). Como se puede observar en la Figura 44 a y b, la superficie interna del capilar está recubierta homogéneamente por la fase polimérica, de aproximadamente 350 nm de espesor. Si se comparan las figuras 44a y 44b se observa que la adición de NPs produce un cambio en la morfología del polímero aumentando la porosidad, tal y como esta descrito en la literatura (Ensie et al., 2014). Este incremento de la porosidad aumenta la difusión del analito dentro de la fase de extracción, y por tanto aumenta la capacidad de extracción.

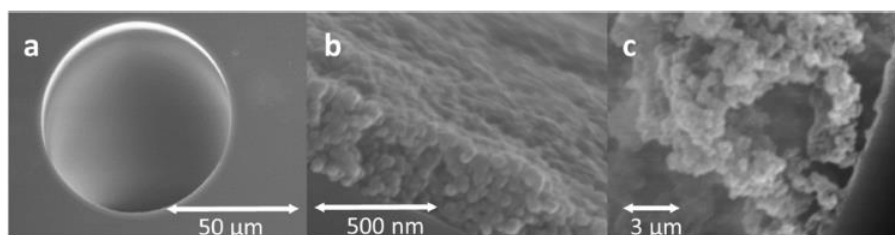


Figura 44. Microfotografías SEM de columnas capilares recubiertas de TEOS-MTEOS (A y B) y TEOS-MTEOS-SiO₂ (C).

Seguidamente se estudió la influencia de la cantidad de NPs de SiO₂ inmovilizadas. En la Figura 45, se muestran las señales obtenida al procesar 500 µL de una disolución patrón conteniendo una mezcla de 25 µg L⁻¹ de desetil-terbutilazina y 2.5 µg L⁻¹ de terbutilazina e irgarol®-1051 empleando un capilar recubierto con TEOS-MTEOS modificado con 0.05, 1.5 y 10 mg mL⁻¹ de NPs de SiO₂. Los resultados obtenidos indican que la cantidad de NPs no produce cambios significativos en la capacidad de extracción de la fase.

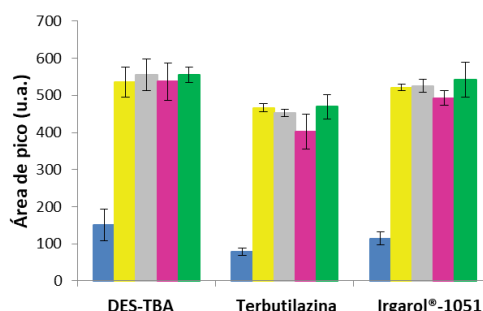


Figura 45. Señal analítica obtenida para desetil-terbutilazina, terbutilazina e irgarol®-1051 empleando capilares recubiertos con TEOS-MTEOS-SiO₂ con diferente concentración de NPs: 0 mg mL⁻¹ (azul), 0.05 mg mL⁻¹ (amarillo), 1.5 mg mL⁻¹ (gris), 5 mg mL⁻¹ (morado) y 10 mg mL⁻¹ (verde) n=3.

Optimización del procedimiento IT-SPME

De todas las fases de extracción comparadas, se seleccionó la fase TEOS-MTEOS modificada con NPs de SiO₂ para el desarrollo de un procedimiento analítico para la determinación de triazinas y productos de degradación. Ello se justifica por la mayor capacidad de extracción que presentaba para la preconcentración de este tipo de compuestos.

Como longitud del capilar se seleccionó 15 cm, puesto que es la longitud mínima que se requiere para poder instalar el capilar en la válvula de inyección. Se descartó emplear capilares de mayor longitud puesto que en estudios preliminares se observó que, debido a la difusión, se obtienen picos más anchos empeorándose la resolución cromatográfica. Con el fin de mejorar la sensibilidad del método se optimizó el volumen de muestra y el volumen de agua en la etapa de lavado.

En la Figura 46 se muestran las señales analíticas obtenidas al procesar diferentes volúmenes de una disolución patrón mezcla de $25 \mu\text{g L}^{-1}$ de desetil-terbutilazina y $2.5 \mu\text{g L}^{-1}$ de terbutilazina e irgarol®-1051. En la figura se observa que los tres pesticidas se comportan de manera similar. La señal analítica aumenta al incrementar el volumen de muestra procesada hasta los 500 μL , volumen para el que se alcanza la capacidad máxima de extracción. Al procesar volúmenes mayores la señal decrece posiblemente debido a la autoelución, es decir, a la desorción de los analitos previamente retenidos en el material sorbente por parte de la propia muestra. Se tomó 500 μL como el volumen de muestra óptimo.

Después de procesar la muestra por el sistema de IT-SPME a menudo se requiere de una etapa de limpieza para eliminar los compuestos de la muestra que no han quedado retenidos en el capilar, a fin de que estos no interfieran en la determinación. En este caso, después de inyectar la muestra se introdujo un pequeño volumen de agua nanopura. De los volúmenes de agua de lavado ensayados, se decidió tomar como volumen óptimo 10 μL ya que según muestran los resultados (Figura 5E b) es el volumen máximo que se puede procesar sin desorber los analitos retenidos de la fase de extracción.

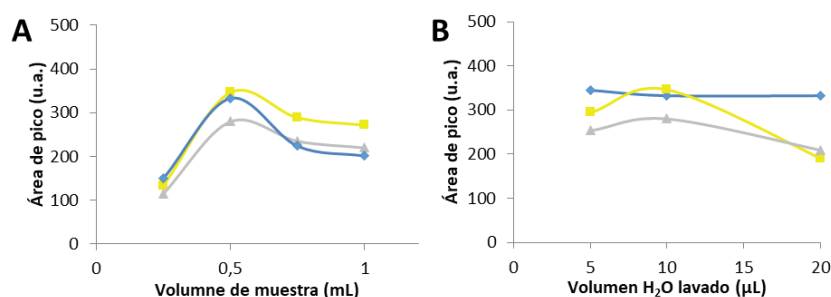


Figura 46. Variación del área de pico obtenida empleando TEOS-MTEOS-SiO₂ para la extracción de una disolución de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ de DES-TBA (azul) y $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de terbutilazina (amarillo) e irgarol®-1051 (gris). A) volumen de muestra; B) volumen de agua en la etapa de lavado.

Parámetros analíticos

En primer lugar se evaluó la precisión de la fase sintetizada. En la Tabla 32 se muestran los valores de RSD (%) obtenidos al procesar una mezcla de desetil-terbutilazina, terbutilazina e irgarol®-1051 por un capilar cubierto con las fases de TEOS-MTEOS y TEOS-MTEOS-SiO₂. Se estudió la precisión comparando los resultados obtenidos con el mismo capilar y los obtenidos utilizando capilares sintetizados diferentes días. Como se puede observar (Tabla 32), la RSD es menor al 13 % para capilares preparados en diferente día y menor al 10 % para el mismo capilar. Por ello, se puede concluir que tanto la síntesis como los resultados obtenidos con los capilares recubiertos con TEOS-MTEOS y TEOS-MTEOS-SiO₂ son reproducibles.

Tabla 32. Precisión (expresada como RSD) para el mismo capilar y capilares de diferentes síntesis recubiertos con la fase de TEOS-MTEOS y TEOS-MTEOS-SiO₂ n=3.

Analito	TEOS-MTEOS		TEOS-MTEOS-SiO ₂	
	Mismo capilar	Diferente síntesis	Mismo capilar	Diferente síntesis
Desetil-terbutilazina	7.4	13.0	7.2	7.0
Terbutilazina	8.4	7.3	9.1	8.7
Irgarol®-1051	9.6	5.0	7.7	11.0

A continuación se obtuvieron los parámetros analíticos para diferentes pesticidas de tipo triazina y productos de degradación ensayados (desisopropil-atrazina, desetil-terbutilazina, 2-hidroxi-terbutilazina, propazina, atrazina, terbutilazina, irgarol®-1051 y M1, el principal producto de degradación del irgarol®-1051. En la Tabla 33 se muestran los parámetros analíticos obtenidos empleando los capilares TRB-5, TEOS-MTEOS y TEOS-MTEOS-SiO₂. Como era de esperar, la fase con NPs es la que proporcionó mayor sensibilidad.

Tabla 33. Parámetros analíticos obtenidos empleando como fase de extracción 1) TEOS-MTEOS-SiO₂, 2) TEOS-MTEOS y 3) TRB-5.

Analito	Recta de calibrado ($y = a + bx$)			LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
	$a \pm s_a$	$b \pm s_b$	R^2		
DESI-ATR ¹	-2 ± 5	5.2 ± 0.1	0.996	0.5	1.5
DESI-ATR ²	-4.6 ± 0.6	0.89 ± 0.02	0.999	1.0	3.0
DES-TBA ¹	3 ± 4	25.6 ± 0.5	0.999	0.1	0.3
DES-TBA ²	14 ± 1	2.5 ± 0.3	0.998	0.3	1.0
DES-TBA ³	-1 ± 1	5.9 ± 0.2	0.995	0.3	1.0
2-OH-TBA ¹	-10 ± 10	16.7 ± 1.0	0.996	0.2	0.6
2-OH-TBA ³	-0.6 ± 1	3.1 ± 0.7	0.999	0.6	8.0
PROP ¹	10 ± 20	167 ± 13	0.994	0.025	0.1
PROP ³	-0.1 ± 1	12.5 ± 0.4	0.998	0.2	0.5
ATR ¹	4 ± 10	111 ± 6	0.997	0.025	0.1
ATR ²	0.2 ± 8	12.8 ± 0.3	0.999	0.2	0.5
TBA ¹	3 ± 5	246 ± 4	0.999	0.025	0.1
TBA ²	3 ± 5	9.8 ± 0.1	0.998	0.05	0.2
TRB ³	2.3 ± 0.7	17.3 ± 0.4	0.998	0.1	0.3
Irgarol [®] -1051 ¹	-9 ± 13	263 ± 15	0.994	0.025	0.1
Irgarol [®] -1051 ²	1.0 ± 0.4	9.6 ± 0.2	0.999	0.05	0.2
Irgarol [®] -1051 ³	0.2 ± 0.8	18.7 ± 0.5	0.998	0.1	0.3
M1 ¹	6 ± 7	12.5 ± 0.2	0.999	0.1	0.3

En la Tabla 35 se comparan los LODs obtenidos para diferentes triazinas y productos de degradación en agua con el procedimiento propuesto, y los obtenidos por otros procedimientos descritos en la literatura que también emplearon un detector DAD. Como se puede observar en dicha tabla, el método propuesto permite determinar los analitos seleccionados a concentraciones de entre 0.5 - 0.025 $\mu\text{g L}^{-1}$, siendo los LODs obtenidos inferiores a los indicados en la mayoría de procedimientos, y suficientes para el análisis de muestras de agua según la legislación europea (Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, del 12 de agosto de 2013).

Tabla 34. LODs obtenidos para triazinas y productos de degradación con diferentes procedimientos descritos en la bibliografía.

Método	LOD (ng L ⁻¹)							Referencia
	DESI-ATR	DES-TBA	2-OH-TBA	PROP	ATR	TBA	IRG	
Magnetic-IT-SPME-CapLC	-	-	-	-	300	300	-	González-Fuenzalida et al., 2014
H-MIMs-LC	-	-	-	110	240	-	-	Zhao et al., 2015
Magnetic-IT-SPME-LC	-	-	-	150	79	100	-	Mei et al., 2016
MIP-HFM-LC	100	-	-	100	30	50	-	Barahona et al., 2016
MF-SPME-LC	-	-	-	-	-	-	1.0	Saleh et al., 2014
IT-SPME-CapLC	-	-	-	-	-	-	15	Sección 4.1.11.
IT-SPME-NanoLC	500	100	200	25	25	25	25	Método propuesto

DESI-ATR: desisopropil-atrazina, PROP: propazina, ATR: atrazina, TBA: terbutilazina, y IRG: irgarol®-1051

Aplicación al análisis de agua y estruvita recuperada

Finalmente, el método propuesto se aplicó a la determinación de triazinas y productos de degradación en 4 muestras de agua de mar y 6 muestras de estruvita recuperada. Las muestras de agua fueron centrifugadas durante 5 min a 6000 rpm antes de ser procesadas por el sistema IT-SPME. Por otro lado, para las muestras de estruvita se aplicó una etapa previa de extracción. El procedimiento utilizado se describe en la Sección 3.3.1.

Tanto las muestras de agua como las de estruvita se fortificaron con el fin de estudiar la recuperación y evaluar la presencia de efecto matriz. Las recuperaciones se calcularon por comparación entre las áreas de pico obtenidas para un determinado analito en la muestra fortificada y las áreas medidas para una disolución patrón de la misma concentración. Para la estruvita las recuperaciones obtenidas se encontraron entre el 82 % y el 115 %, y para las muestras de agua entre el 90 % y el 106 %. Los valores obtenidos son próximos al 100 %; por tanto se puede considerar que no hay efecto matriz.

En la Figura 47 se muestran los cromatogramas obtenidos para una muestra de agua de mar, una muestra estruvita recuperada y para las mismas muestras fortificadas con 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ de desetil-terbutilazina y 0.25 $\mu\text{g L}^{-1}$ de terbutilazina e Irgarol®-1051. Los contaminantes estudiados no se encontraron en las muestras de agua y estruvita analizadas, a excepción de una muestra de agua de mar y otra de estruvita en las que sí se detectó irgarol®-1051, pero a una concentración inferior al LOQ (Figura 47). La presencia de este compuesto fue confirmada al comparar el espectro de absorción UV-vis del pico sospechoso de la muestra con el espectro de un patrón.

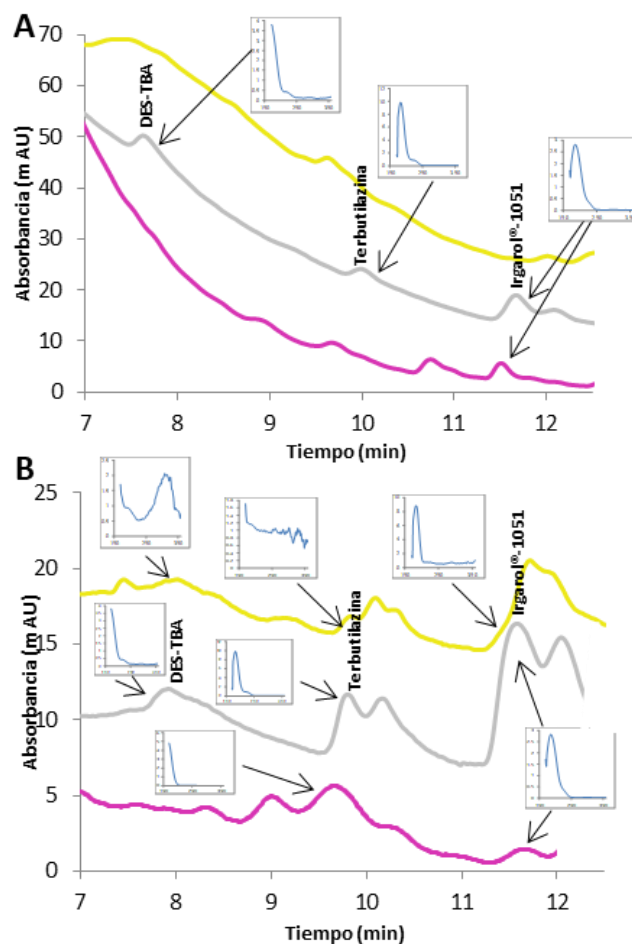


Figura 47. Cromatogramas obtenidos para una muestra de A) agua de transición y B) estruvita. Muestra (amarillo), muestra fortificada con desetil-terbutilazina ($2 \mu\text{g L}^{-1}$), terbutilazina e irgarol®-1051 ($0.25 \mu\text{g L}^{-1}$) (gris) y muestra positiva en irgarol®-1051 (morado). En azul se muestran los espectros de absorción UV de los picos correspondientes a analitos e interferentes.

Conclusiones

En este trabajo se estudió la utilización del material polimérico de TEOS-MTEOS modificado con NPs de SiO₂ como fase de extracción para IT-SPME acoplada a NanoLC. Como analitos se seleccionaron diferentes triazinas polares y algunos de sus productos de degradación. En primer lugar se optimizó la etapa de extracción, obteniéndose la máxima señal al procesar 500 µL de muestra y emplear 10 µL de agua nanopura para limpiar el capilar de extracción de restos de la matriz que no habían quedado retenidos en la fase de extracción. Por otro lado, se evaluó la síntesis de la fase de extracción, observándose que para las concentraciones de NPs seleccionadas no había una diferencia significativa en las respuestas. Además, se estudió la precisión de la síntesis, obteniéndose una RSD inferior al 13 % al procesar una disolución patrón con una mezcla de triazinas con capilares sintetizados en días diferentes. Por tanto, se puede concluir que la síntesis es reproducible.

Respecto a la capacidad de extracción de la fase desarrollada, ésta es muy superior a la capacidad de extracción obtenida con la fase comercial TRB-5, independientemente de si se encuentra modificada o no con c-CNTS. El método propuesto permite la determinación de triazinas y productos de degradación a concentraciones superiores a 0.5 – 0.025 µg L⁻¹. Por tanto, la sensibilidad obtenida es adecuada para el análisis de muestras ambientales, según las exigencias de la legislación europea. Además el método propuesto es mucho más sensible que la mayoría de procedimientos descritos en bibliografía que utilizan un detector DAD.

4.2.2.2 Estudio de la capacidad de extracción de la fase TEOS-MTEOS dopada con nanopartículas de SiO₂ y TiO₂ para la extracción y preconcentración de diferentes pesticidas

En vista de la elevada capacidad de extracción obtenida al emplear como columna de extracción un capilar de sílice recubierto con un polímero de TEOS-MTEOS modificado con NPs de SiO₂, se amplió el estudio a la extracción de otros pesticidas con diferente estructura y polaridad. Además, también se ha incluido en el estudio la utilización de la fase TEOS-MTEOS modificada con NPs de TiO₂.

Optimización IT-SPME

En primer lugar se optimizaron las condiciones para la IT-SPME. Como longitud del capilar se seleccionó 15 cm.

El volumen de muestra procesada por el sistema de extracción fue optimizado. Para ello, se procesaron volúmenes crecientes de muestra desde 250 µL hasta 750 µL. Como se puede observar en la Figura 48, para la mayoría de los analitos el área de pico aumentó al aumentar el volumen de muestra, pero cuando se introdujeron más de 500 µL la señal analítica disminuía debido a la autoelución de los analitos. El fluometurón es el único compuesto cuya señal analítica disminuyó cuando se procesaron más de 250 µL, probablemente debido a su menor interacción con la fase de extracción. A pesar de ello, para el resto de compuestos el aumento de señal al utilizar 500 µL fue significativo, por lo que se seleccionó dicho valor como volumen de muestra óptimo.

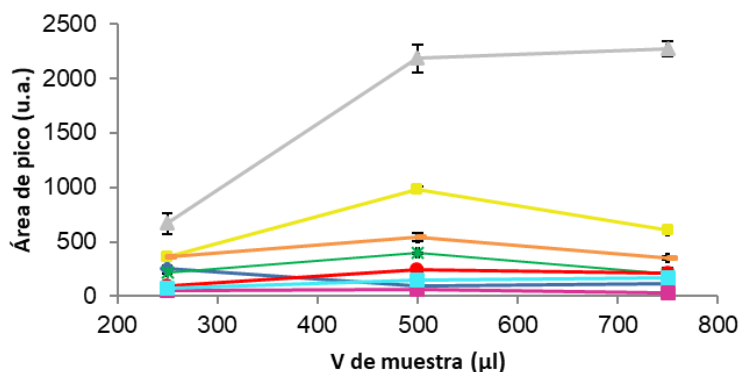


Figura 48. Variación del área de pico según el volumen de muestra procesado por el capilar de TEOS-MTEOS-TiO₂. Fluometurón (azul), linurón (amarillo), fentión (gris), metobromurón (morado), fenamifós (verde), isoprotrurón (rojo), fenitrotión (turquesa) y bifenox (naranja).

Estudio de la capacidad de extracción

Una vez optimizadas las condiciones de extracción, se comparó el área de pico de cada uno de los analitos al procesar una disolución patrón que contenía estos compuestos, empleando como fase de extracción las columnas capilares recubiertas con los polímeros de TEOS-MTEOS modificados con NPs de SiO₂ y con NPs de TiO₂ (Figura 49).

Todos los compuestos incluidos en este estudio poseen un log Kow parecido (Tabla 9, 10 y 11), es decir, tienen similar polaridad y por tanto, las diferencias en su interacción con las fases extractivas van a depender de sus estructuras químicas. Teniendo en cuenta los grupos funcionales de los analitos (tablas 9-11), cabe esperar que la retención de estos compuestos en la fase de extracción se deba a interacciones de tipo hidrofóbico, hidrofílico y en algunos casos interacciones tipo puente de hidrógeno.

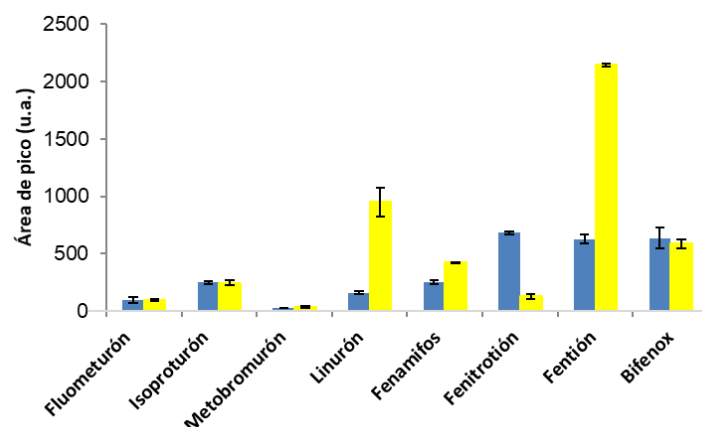


Figura 49. Áreas de pico obtenidas con los capilares de TEOS-MTEOS dopados con NPs de SiO₂ (azul) y TiO₂ (amarillo).

Los resultados obtenidos (Figura 49) muestran que para una misma fase la capacidad de extracción es diferente incluso para analitos cuya estructura química es muy parecida. Por ejemplo, mientras la capacidad de extracción es similar en ambas fases para las fenilureas fluometurón, isoproturón y metobromurón, el linurón presenta una mayor afinidad por la fase funcionalizada con NPs de TiO₂. La principal diferencia entre estas fenilureas es el tipo de sustituyentes del grupo aromático. La presencia de dos sustituyentes contiguos con carga negativa parcial ha sido la justificación aportada por Banitaba, Davarani & Pourahadi, 2013, para explicar la fuerte afinidad observada entre éteres de ftalato y la superficie de un sorbente de TiO₂. Los autores sugieren que la retención se debe a la formación de interacciones mono y bidentadas entre la carga parcial negativa de los sustituyentes y la carga positiva parcial del TiO₂. En este caso, la molécula de linurón posee dos sustituyentes electronegativos (halógenos) en su estructura, los cuales podrían facilitar una interacción similar a la descrita por Banitaba y colaboradores con las NPs de TiO₂. Este fenómeno que podría explicar las diferencias observadas en la capacidad de extracción según las NPs utilizadas.

Por otro lado, diferentes estudios (Lin et al., 2008; Wang et al., 2012) han demostrado la afinidad del TiO_2 por los compuestos que contienen grupos fosfato. Los resultados mostrados en la Figura 49 indican que modificar el polímero con NPs de TiO_2 es la mejor opción para incrementar la extracción de los compuestos organofosforados fenamifós y fentión. Sin embargo, la capacidad de extracción del fenitrotión es mayor para la fase con NPs de SiO_2 . Este resultado puede ser explicado por la presencia de grupos nitro en la estructura del pesticida, los cuales podrían establecer interacciones adicionales de tipo dipolo-dipolo con la sílice ionizada del sorbente. Esta posibilidad está de acuerdo con los resultados obtenidos para el bifenox, el cual también posee sustituyentes nitro y para el que la señal analítica es mayor cuando se utiliza el polímero de TEOS-MTEOS modificado con NPs de SiO_2 .

Conclusiones

En este apartado se han mostrado los resultados obtenidos al emplear como fase de extracción para IT-SPME acoplada a NanoLC un capilar de sílice recubierto por un material polimérico de TEOS-MTEOS modificado con NPs de SiO_2 o TiO_2 . Ambas fases han sido utilizadas para la extracción de diferentes pesticidas.

Los resultados obtenidos confirman que la capacidad de extracción del material sorbente está estrechamente relacionada con las interacciones que se establecen entre el sorbente y los grupos funcionales de los analitos.

Los resultados obtenidos al comparar ambas fases indican que en general la fase de TEOS-MTEOS modificada con NPs de TiO_2 presenta mayor capacidad de retención para los analitos estudiados. Sin embargo, la fase con NPs de SiO_2 muestra una elevada afinidad por los compuestos con grupos nitro como el bifenox y el fenitrotión.

4.2.2.3 Capilares recubiertos con TEOS-MTEOS dopado con NPs metálicas y de óxidos metálicos para la extracción de triazinas y sulfonilureas

En este apartado se realizó un estudio comparativo de la capacidad de extracción de la fase de TEOS-MTEOS modificada con NPs metálicas de Au y Ag con diferente recubrimiento (capping), así como con NPs de óxidos metálicos como Al_2O_3 , ZnO , ZrO_2 , Fe_2O_3 o CuO y NPs de SiO_2 . Para este estudio se seleccionaron diferentes contaminantes ambientales de carácter polar, concretamente diferentes triazinas y sulfonilureas.

Fases sintetizadas

En primer lugar se verificó mediante imágenes SEM que, independientemente de las nanopartículas utilizadas, el material polimérico de TEOS-MTEOS formado sobre la superficie de las paredes internas del capilar de sílice fundida presentaba una morfología adecuada para la extracción. Como ejemplo ilustrativo, en la Figura 50 se muestran las imágenes obtenidas de un capilar recubierto con el material polimérico modificado con NPs de TiO_2 .

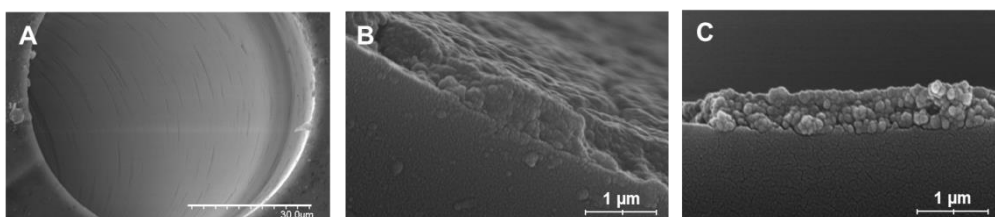


Figura 50. Imágenes SEM de capilares de TEOS-MTEOS dopados con NPs de: A y B) TiO_2 y C) TiO_2 y CuO (una dispersión de 0.025 mg mL^{-1} de cada una).

Por otro lado, se realizó un estudio comparativo del perfil cromatográfico obtenido con cada una de las fases de extracción modificadas y el obtenido con la fase de TEOS-MTEOS sin modificar. Para ello se procesaron diferentes blancos (agua nanopura) y disoluciones patrón de los analitos, en cada una de las fases propuestas. En la Figura 51, se muestran los cromatogramas obtenidos para los blancos. Como se puede observar, los perfiles cromatográficos obtenidos son bastante similares para todas las fases ensayadas, excepto para la fase modificada con NPs de Al_2O_3 que dio lugar a un mayor número de picos de fondo.

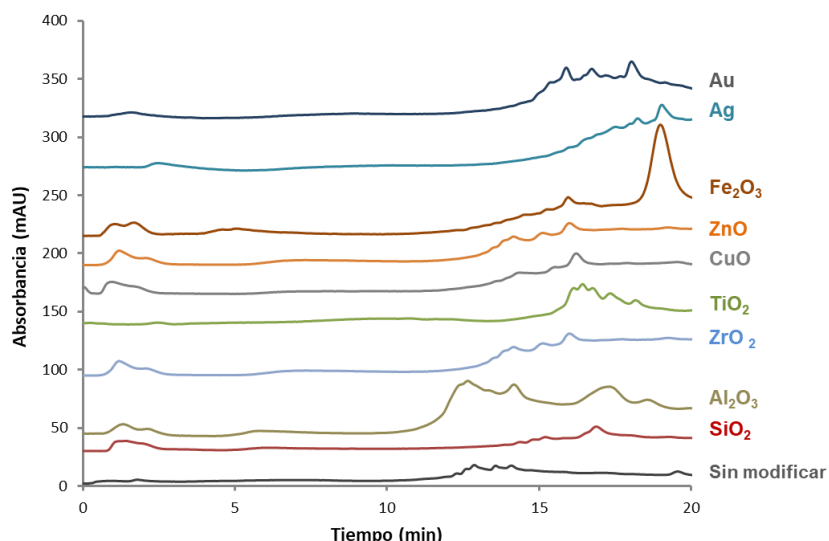


Figura 51. Cromatogramas obtenidos a 230 nm al procesar 500 μL de agua nanopura por los diferentes capilares de TEOS-MTEOS dopado con las NPs ensayados. Los recubrimientos con NPs de Ag y Au se prepararon a partir de dispersiones de 20 nm y 40 nm de tamaño, respectivamente.

Asimismo, se observaron pequeñas variaciones en el tiempo de retención de los analitos según la fase de extracción utilizada. Además en algunos casos las NPs utilizadas influyeron significativamente en el perfil de los pico cromatográficos. Por ejemplo, para los compuestos más polares iodosulfurón-metil, tritosulfurón, tribenurón-metil y metribuzina se obtuvieron picos más anchos cuando la extracción se realizó con la fase TEOS-MTEOS modificada con NPs de Au o Ag que cuando se empleó polímero sin modificar. Esta observación sugiere que al modificar la fase con dichas NPs se incrementa la interacción con los analitos polares respecto a la fase sin modificar.

Por otro lado, no se observaron diferencias en los perfiles de pico entre estas fases modificadas y la fase sin modificar para la desetil-terbutilazina, la terbutilazina y el irgarol®-1051, a pesar de que sí se obtuvieron diferencias en las áreas de pico según la fase utilizada. En la Figura 52 se muestran los cromatogramas obtenidos para una disolución con una mezcla de iodosulfurón-metil, desetil-terbutilazina e irgarol®-1051 empleando como fase de extracción TEOS-MTEOS sin modificar y modificado con NPs de Au y Ag.

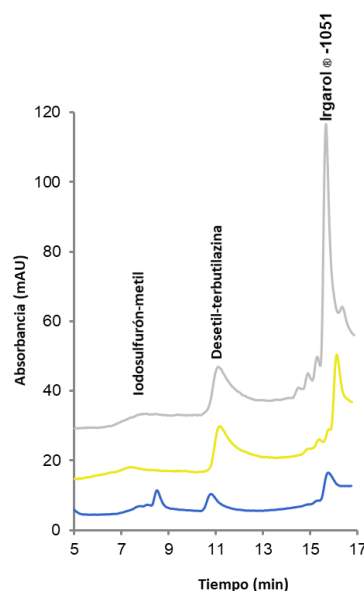


Figura 52. Cromatogramas obtenidos a 230 nm para una disolución patrón de iodosulfurón-metil ($25 \mu\text{g L}^{-1}$), desetil-terbutilazina ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) e irgarol®-1051 ($2.5 \mu\text{g L}^{-1}$) empleando capilares recubiertos TEOS-MTEOS sin modificar (azul) y modificado con NPs de Ag de 20 nm (gris) y NPs de Au de 40 nm (amarillo), ambas estabilizadas en tampón citrato.

Cabe remarcar que los perfiles de pico obtenidos con las fases modificadas con NPs de sílice y óxidos metálicos son similares a los obtenidos con la fase polimérica sin modificar. No obstante, la incorporación de NPs a la fase polimérica de TEOS-MTEOS supone una modificación de la capacidad de extracción respecto de la fase sin modificar.

Para evaluar y comparar los efectos en las eficiencias de extracción según el tipo de NPs se ha utilizado una vez más el índice de preconcentración (IP). Los IPs obtenidos para todas las fases comparadas se muestran en las tablas 35 y 36; estos valores se obtuvieron procesando por triplicado disoluciones patrón de los analitos de concentraciones en el intervalo de 5 a $25 \mu\text{g L}^{-1}$.

Tabla 35. IPs obtenidos empleando TEOS-MTEOS modificado con NPs de Au y Ag.

Tipo de NPs			Compuesto /IP							
Tipo	Tamaño (nm)	Capping	ISM	TSM	TBM	MTB	DES-TBA	TFM	TBA	IRG
Au	5	Citrato	1.0	0.4	0.1	0.5	1.2	1.2	4.0	2.1
	20	Citrato	-	0.5	-	0.5	1.1	2.1	4.1	2.6
	40	Citrato	0.5	0.4	0.6	1.0	3.6	2.5	3.0	2.4
	5	Fosfato	-	0.3	0.1	0.2	0.5	0.5	2.3	0.3
	20	Fosfato	-	0.3	0.2	0.6	0.7	0.9	2.9	1.0
	40	Fosfato	0.6	0.3	0.2	0.9	0.8	0.6	0.8	3.0
	25-30	-	0.4	0.4	0.2	0.6	0.9	2.0	2.6	2.6
Ag	20 ^a	Citrato	0.6	0.5	1.5	1.7	3.6	11.4	8.7	6.2
	20 ^b	Citrato	-	0.3	0.5	0.8	1.0	2.5	6.7	4.3
	40	Citrato	1.0	0.4	0.3	1.0	1.1	4.7	8.9	4.5
	40	Glicerol	0.7	0.4	0.3	0.9	0.8	0.9	0.9	0.8

a) Preparada a partir de una suspensión de 0.02 mg mL⁻¹; b) preparada a partir de la misma dispersión diluida 1: con agua nanopura.

Tabla 36. IP sobtenidos empleando TEOS-MTEOS modificado con NPs de óxidos metálicos.

Tipo de NPs	Compuesto /IP							
	ISM	TSM	TBM	MTB	DES-TBA	TFM	TBA	IRG
SiO ₂	1.5	1.2	1.4	1.8	2.4	3.5	6.6	4.9
Al ₂ O ₃	1.1	1.5	0.4	1.0	1.1	1.1	1.7	1.8
ZrO ₂	1.7	0.9	0.6	1.3	1.4	1.4	1.4	1.4
TiO ₂	1.4	1.5	1.8	1.9	2.6	5.5	11.1	7.2
CuO	1.8	1.7	1.4	2.9	5.2	5.3	8.6	4.0
ZnO	1.8	1.3	0.5	1.4	1.2	1.1	0.9	1.1
Fe ₂ O ₃	1.2	0.7	1.0	1.7	1.9	4.2	8.8	3.7
TiO ₂ /CuO ^a	1.7	1.3	1.6	2.0	2.7	8.1	17.5	7.2
TiO ₂ - CuO	2.8	2.0	2.3	3.0	5.7	27.3	30.4	20.5

a) Preparado a partir de una dispersión de 0.025 mg mL⁻¹ de cada tipo de NPs.

Efecto en la eficiencia de extracción empleando NPs de Au

Los IPs obtenidos empleando las fases modificadas con NPs de Au se muestran en la Tabla 35. Como se puede observar, la incorporación de NPs de Au en el material polimérico supone un empeoramiento de la señal analítica para los compuestos más polares iodosulfurón-metil, tritosulfurón, tribenurón-metil y metribuzina ($IPs \leq 1$). En algunos casos no se pudo integrar el área a causa del ensanchamiento de los picos. La Tabla 35 indica que el tipo de dispersión utilizado para estabilizar las NPs también afecta a la eficiencia de extracción. Las columnas preparadas con una dispersión de NPs de Au en tampón citrato generalmente proporcionan mayor señal analítica. Cabe destacar que se obtienen IPs mayores cuando la fase polimérica se modifica con NPs de Au de 20 nm y 40 nm de tamaño de partícula. No obstante, la mejora en la señal analítica fue moderada ($IPs \leq 4.1$) y únicamente para los analitos triflusulfurón-metil, terbutilazina e irgarol®-1051.

Efecto en la eficiencia de extracción empleando NPs de Ag

Respecto al uso de TEOS-MTEOS modificado con NPs de Ag, los valores de IP obtenidos para los compuestos más polares iodosulfurón-metil, tritosulfurón, tribenurón-metil y metribuzina han sido en la mayoría de casos menores que 1 (Tabla 35), es decir, no se mejora la extracción respecto a la fase sin modificar. Sin embargo, la presencia de NPs de Ag en la fase de extracción mejoró la capacidad de extracción del polímero para los compuestos con mayor log Kow (triflusulfurón-metil, terbutilazina, e irgarol®-1051). Los resultados de la Tabla 35 indican que la fase de extracción modificada con una dispersión NPs de Ag (20 mg mL⁻¹) de 20 nm de diámetro estabilizadas con tampón citrato mejora la interacción con muchos de los analitos. Al incrementar el tamaño de partícula o al disminuir la cantidad de NPs se produce un empeoramiento de la señal analítica. También se estudió la utilización de NPs de Ag estabilizadas con glicerol, obteniéndose $IPs < 1$ para todos los analitos, lo cual sugiere que la estructura polimérica resultante no es tan favorable.

De acuerdo con la literatura, las NPs de Ag son un buen sorbente para la extracción de compuestos orgánicos ya que pueden establecer interacciones hidrofóbicas (Feng et al., 2010), lo cual es consistente con los resultados mostrados en la Tabla 35. Cabe remarcar que utilizando la fase de extracción modificada con NPs de Ag que mejor resultados proporciona (20 nm en tampón citrato sin diluir) se observa un incremento significativo del área de pico para el triflusulfurón-metil (IP = 11.4) y la terbutilazina (IP = 8.4), pero este incremento es inferior para el irgarol®-1051 (IP = 6.2), a pesar que los tres compuestos presentan una polaridad parecida ($\log K_{ow}$ 3.10-3.21). Estas diferencias pueden ser debidas a la presencia de grupos ricos en electrones (halógenos) en la estructura del triflusulfurón-metil y terbutilazina que interaccionarían fuertemente con las NPs de Ag, ya que estas se comportan como aceptores de electrones (Sun, Feng, Bu & Luo, 2015). Por todo ello, se puede concluir que a pesar de que las interacciones hidrofóbicas son predominantes, la presencia de NPs de Ag mejora la eficiencia de extracción de compuestos con grupos donantes de electrones.

Efecto en la eficiencia de extracción empleando NPs de sílice y óxidos metálicos.

En la Tabla 36 se muestran los IPs obtenidos empleando las fases de extracción modificadas con NPs de SiO₂ y de óxidos metálicos. Como se observa en esta tabla, la presencia de este tipo de NPs en la fase de extracción tiene un efecto moderado ($IPs \leq 3.3$) en la extracción de los compuestos más polares iodosulfurón-metil, tribenurón-metil, tritosulfurón y metribuzina, sin importar el tipo de NPs.

A diferencia de las fases modificadas con NPs de Au y Ag, solo se obtuvieron IPs menores a 1 con dos de las fases estudiadas, y únicamente para el tribenurón-metil. En general, se observó una ligera mejora de la capacidad de extracción para todos los analitos ($IPs \leq 1.8$) con las fases modificadas con NPs de Al₂O₃, ZrO₂ y ZnO. Este efecto fue superior cuando la fase de extracción se modificó con NPs de SiO₂ o Fe₂O₃.

Los máximos IPs para todos los analitos se obtuvieron empleando las fases de extracción dopadas con NPs de TiO_2 y de CuO . Sin embargo ambas columnas exhiben diferente selectividad. Mientras que la fase modificada con NPs de CuO presentaba una elevada capacidad de extracción para los analitos más polares iodosulfurón-metil, tritosulfurón, metribuzina y desetil-terbutilazina (a excepción del tribenurón-metil), la fase modificada con NPs de TiO_2 proporcionó los mejores resultados para los compuestos menos polares triflusulfurón-metil, terbutilazina e irgarol®-1051. Es decir, con ambas fases se mejora la capacidad de extracción respecto a la fase sin modificar, pero con diferente selectividad: cuando se utiliza la fase modificada con NPs de CuO se mejora la extracción de los compuestos más polares y cuando el polímero se modifica con NPs de TiO_2 se incrementa la extracción de los compuestos más apolares.

El hecho de obtener $\text{IPs} > 1$ indica que las NPs inmovilizadas en la fase polimérica introducen nuevos mecanismos de interacción, que se suman a las interacciones hidrofóbicas de la fase TEOS-MTEOS. La presencia de NPs de SiO_2 y de óxidos metálicos en la fase de extracción aumenta el número de sitios activos que pueden interaccionar con los analitos debido a la presencia de grupos hidroxilo en su superficie, capaces de establecer con los analitos interacciones por puente de hidrógeno, dipolo-dipolo, ion-dipolo y Van-der-Waals (Černigoj et al., 2016).

Además, las NPs de óxidos metálicos pueden actuar como ácidos de Lewis y por tanto retener compuestos que se comporten como bases de Lewis (Xu et al, 2016). Por tanto, es de esperar que la acidez del óxido metálico influya en la eficiencia de extracción. En este caso, de todas las NPs ensayadas, el TiO_2 es más ácido (Jeong, Lee, Tae, Lee & Yoon, 2008) y es el que en general mayor capacidad de extracción presenta, de acuerdo con los resultados mostrados en el Tabla 36. No obstante, otros factores como el tamaño de las NPs, la carga superficial o la estabilidad de la dispersión de las NPs durante la síntesis, influyen en la capacidad de extracción del polímero, probablemente al determinar su morfología (Bagheri & Roostaie, 2015).

Como se observa en la Figura 42, la fase modificada con NPs de TiO_2 presenta una adecuada homogeneidad y área superficial. En principio, cabe esperar un aumento del número de sitios disponibles si se incrementa la cantidad de NPs inmovilizadas. Por esa razón se prepararon capilares recubiertos con diferente cantidad de NPs de TiO_2 . Las concentraciones de NPs estudiadas en la mezcla de monómeros varió entre 0.01 mg mL^{-1} y 5 mg mL^{-1} . En todos los casos se observaron perfiles de pico adecuados y diferentes áreas de pico según la cantidad de NPs inmovilizadas, obteniéndose mayor señal analítica con las fases preparadas a partir de dispersiones de NPs en el rango 0.05 a 1 mg mL^{-1} . Un incremento de la cantidad de NPs supone una disminución de la señal analítica (Figura 53), lo que puede explicarse por el hecho de que la dispersión de NPs es menos estable (Zhou, Huang & Xie, 2012).

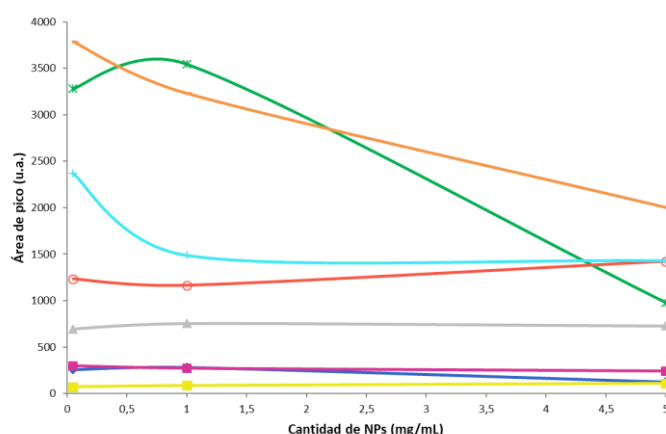


Figura 53. Variación del área de pico en función del contenido de NPs de TiO_2 usado en la síntesis de la fase de extracción. $25 \mu\text{g L}^{-1}$ de iodosulfurón-metil (azul), tritosulfurón (amarillo) y metribuzina (morado); $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de desetil-terbutilazina (verde), $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de tribenurón-metil (gris), $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de triflusulfurón-metil (rojo) y $2.5 \mu\text{g L}^{-1}$ de terbutilazina (turquesa) e irgarol®-1051 (naranja).

En vista de los resultados obtenidos (Tabla 36) se fabricaron capilares de extracción recubiertos por el material polimérico de TEOS-MTEOS modificado con mezclas de NPs de TiO_2 y CuO . Para ello se estudiaron dos proporciones diferentes de mezcla de NPs, con una concentración total de NPs de 0.050 mg mL^{-1} y 0.10 mg mL^{-1} , respectivamente. Las imágenes SEM de ambas fases (Figura 42) demuestran que se trata de polímeros homogéneos con una elevada porosidad. Por otro lado, los cromatogramas obtenidos con estas fases son similares a los obtenidos con las fases modificadas con un único tipo de NPs (Figura 54).

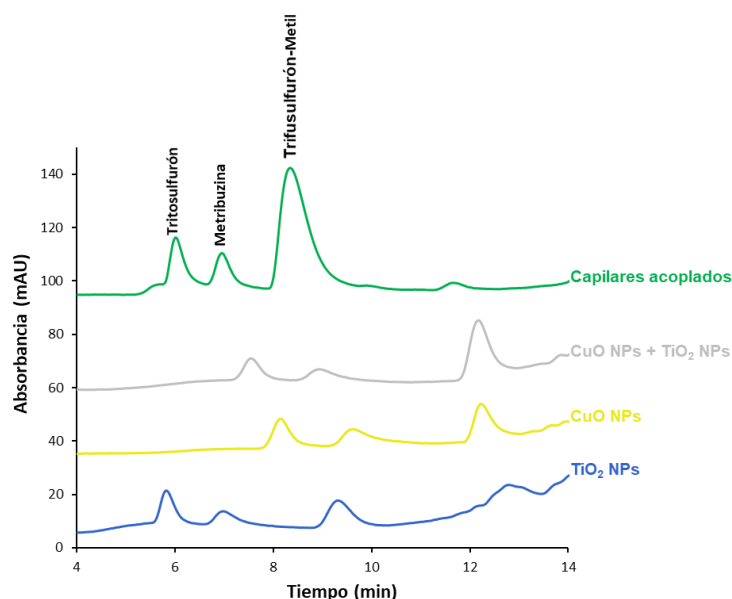


Figura 54. Cromatogramas obtenidos a 230 nm para una disolución patrón mezcla de tritosulfurón ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$), metribuzina ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$) y triflusulfurón-metil ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) empleando un capilar de TEOS-MTEOS dopado con NPs de TiO_2 , de CuO y una mezcla de ambos, y el sistema con dos capilares acoplados en serie.

Los IPs obtenidos empleando las fases de extracción modificadas con mezclas NPs de TiO_2 y CuO se muestran en la Tabla 36. Como puede comprobarse, los valores fueron similares a los obtenidos con la fase de NPs de TiO_2 para la mayoría de compuestos, excepto para el triflusulfurón-metil y la terbutilazina, cuyos IPs fueron significativamente mejores, 8.1 y 17.5, respectivamente.

Acoplamiento de dos capilares de extracción en serie

Adicionalmente se evaluó la posibilidad de acoplar en serie dos capilares con diferente selectividad. Para ello se empleó un capilar recubierto con el polímero de TEOS-MTEOS modificado con NPs de TiO_2 y otro modificado con NPs de CuO, conectados ambos mediante una válvula automática de 10 puertos (Figura 55).

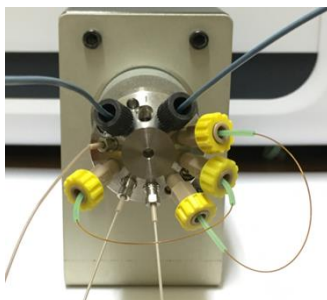


Figura 55. Fotografía de la válvula de inyección automática de 10 puertos con los dos capilares de extracción acoplados en serie.

En primer lugar se optimizó el volumen de muestra procesado en el sistema, controlando el tiempo de transferencia, es decir, el tiempo transcurrido desde que se gira la válvula de 6 vías a la posición de inyección hasta que se gira la válvula de 10 vías a la posición de inyección (Sección 4.2.1). Se observó que la respuesta analítica aumentaba cuando el volumen de muestra procesado se incrementó de 50 a 200 μL manteniéndose aproximadamente constante para volúmenes superiores. Cuando se procesaron volúmenes de muestra superiores, la señal decreció drásticamente. Se seleccionó 200 μL (tiempo de transferencia 4 min) como volumen de muestra óptimo. Por otro lado, se evaluó el efecto del orden de los capilares en la válvula de 10 vías, sin observarse diferencias significativas en la señal analítica.

Las señales analíticas obtenidas para todos los analitos empleando este sistema fueron en general muy superiores a las obtenidas con la configuración de un único capilar. Los IPs obtenidos se encuentran en el rango de 2 a 30.4 (Tabla 36). Por tanto, se puede afirmar que el acoplamiento en serie de un capilar de TEOS-MTEOS modificado con NPs de CuO y un capilar de TEOS-MTEOS modificado con NPs de TiO_2 es una alternativa para mejorar la eficiencia de extracción de este tipo de compuestos.

En la Tabla 37, se muestran los LODs y las RSDs obtenidas empleando los capilares tanto individualmente como acoplándolos en serie. Como se puede observar, los LODs son menores cuando ambos capilares se acoplan en serie, excepto para la metribuzina, permitiendo la detección al nivel inferior a los $\mu\text{g mL}^{-1}$ en la mayoría de los casos. Las RSDs $\leq 10\%$, por lo que se consideró que la precisión era satisfactoria, teniendo en cuenta los niveles de concentración de las disoluciones de trabajo.

Tabla 37. LODs y RSD para los capilares de TEOS-MTEOS dopados con NPs de TiO₂ y CuO, y para ambos capilares acoplados en serie.

Compuesto	Capilares Individuales				Capilares acoplados en serie	
	TiO ₂ NPs		CuO NPs			
	LODs (µg L ⁻¹)	RSD (%)	LODs (µg L ⁻¹)	RSD (%)	LODs (µg L ⁻¹)	RSD (%)
Iodosulfurón-metil	2	6	2.5	4	0.4	8
Tritosulfurón	1	4	1	6	0.6	2
Tribenurón-metil	0.5	8	0.5	2	0.25	10
Metribuzina	0.75	4	0.5	2	1.5	7
Desetil-terbutilazina	0.5	3	0.2	5	0.04	6
Triflusulfurón-metil	0.15	2	0.15	1.2	0.02	4
Terbutilazina	0.04	4	0.05	4	0.02	8
Irgarol®-1051	0.03	6	0.1	5	0.025	9

Por otro lado, se evaluó la precisión entre capilares con las fases modificadas con NPs de TiO_2 y con NPs de CuO . Los valores de RSD ($n=3$) obtenidos se encuentran en el rango del 4 % al 14 % para las NPs de TiO_2 , y del 3 % al 12 % para la fase modificada con NPs de CuO (Tabla 38). Cabe resaltar que a lo largo del estudio los capilares fueron utilizados más de 100 veces sin observarse una disminución significativa en su capacidad de extracción.

Tabla 38. Precisión entre capilares ($n=3$).

Analito	Precisión (RSD, %)	
	TiO_2	CuO
Iodosulfuón-metil	11	3
Tritosulfurón	4	5
Tribenurón-metil	5	7
Metribuzina	8	10
Desetil-terbutilazina	10	9
Triflusulfurón-metil	14	12
Terbutilazina	8	9
Irgarol®-1051	9	9

Finalmente, los capilares sintetizados se aplicaron al análisis de diferentes aguas medioambientales. Para ello se seleccionó la configuración de IT-SPME con dos capilares acoplados en serie, puesto que con esta configuración se consigue una mayor sensibilidad para la mayoría de los pesticidas ensayados. Los cromatogramas obtenidos para una muestra de agua de mar en la que no se encontró ninguno de los compuestos estudiados y la misma muestra fortificada con diversos analitos, se muestra en la Figura 56. Como se puede observar, los cromatogramas obtenidos son similares a los obtenidos para las disoluciones patrón. Las áreas de pico de las muestras fortificadas se utilizaron para evaluar la recuperación, obteniéndose valores en el rango de 80 a 107 %.

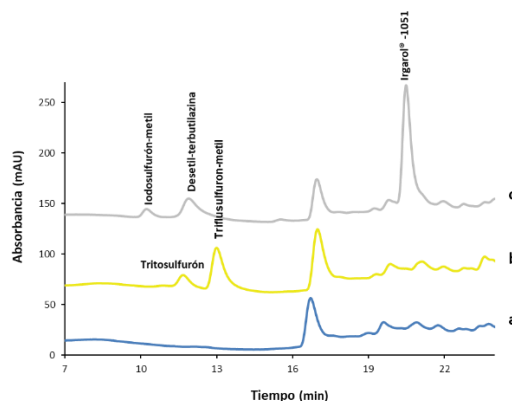


Figura 56. Cromatogramas obtenidos a 230 nm con la configuración de dos capilares acoplados para una muestra de agua de mar (azul), la misma muestra fortificada con tritosulfurón ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$) y triflusulfurón-metil ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) (amarillo) y con iodosulfurón-metil ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$), desetil-terbutilazina ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) e irgarol®-1051 ($2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) (gris).

En dos de las muestras analizadas se encontró terbutilazina ($t_r = 13.6 \text{ min}$) a una concentración similar al LOD y LOQ, respectivamente (Figura 49A). Se comparó el espectro de absorción del pico a 13.6 min de los cromatogramas de las muestras con el espectro obtenido para una disolución patrón de terbutilazina. Como se puede observar en la Figura 49B ambos espectros son similares, lo que permitió confirmar la presencia de terbutilazina en ambas muestras.

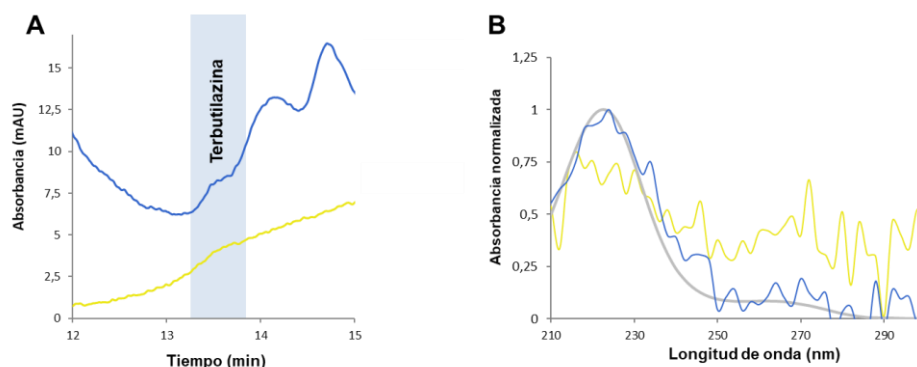


Figura 57. A) Cromatogramas obtenidos a 230 nm con la configuración de dos capilares acoplados en serie para dos muestras de agua positivas en terbutilazina. B) Espectros UV normalizados de los picos sospechosos de ser terbutilazina en los cromatogramas de A y para una disolución patrón de este compuesto ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Conclusiones

Los resultados obtenidos muestran que modificar el polímero de TEOS-MTEOS con NPs metálicas o NPs de óxidos metálicos es una manera sencilla de incrementar la sensibilidad en IT-SPME-NanoLC. La eficiencia de la extracción depende de las propiedades del material sorbente, las cuales están determinadas por el tipo y la cantidad de NPs utilizadas, así como por la estructura de los analitos. Para los analitos menos polares ($\log K_{ow} \geq 3$) se han observado ligeros incrementos de área usando la fase modificada con NPs de Au; sin embargo con este tipo de NPs para los analitos más polares decrece la señal analítica. Similar tendencia se observa cuando se emplea el polímero modificado con NPs de Ag, aunque en este caso la señal se incrementa considerablemente para los analitos que contienen halógenos en su estructura como el triflurosulfurón-metil o la terbutilazina.

La mayor eficiencia de extracción se ha obtenido empleando las fases modificadas con NPs de CuO y NPs de TiO₂ para los analitos más polares y menos polares, respectivamente. La extracción puede ser incrementada si se modifica la fase polimérica con ambas NPs, o si se acoplan en serie 2 capilares, cada uno con un tipo de NPs. Esta última opción proporciona áreas hasta 30 veces superiores a las obtenidas empleando como fase de extracción el polímero de TEOS-MTEOS sin modificar.

La combinación de IT-SPME con los sorbentes modificados con NPs estudiados, y NanoLC permite la determinación de herbicidas polares de tipo triazinas y sulfonilureas ($\log K_{ow} = -0.7- 3.21$) con LODs en el rango 0.02- 1.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ y con una adecuada precisión.

4.2.2.4 Estudio de la degradación de tribenurón-metil en muestras de aguas ambientales

En el siguiente apartado se describen los resultados obtenidos en el estudio de la degradación del herbicida tribenurón-metil (TBM) en muestra de aguas ambientales.

Separación cromatográfica y cuantificación de TBM y de sus productos de degradación

De acuerdo con la bibliografía, en condiciones ambientales el herbicida TBM se hidroliza rompiéndose el enlace sulfonilurea, lo que da lugar a dos principales productos de degradación, el metil-2-(aminosulfonil) benzoato (MASB) y la 2-metoxi-4-metilamino-6-metil-1,3,5-triazina (TRZ); en el medio ambiente, la TRZ puede ser transformada a su vez en sacarina (SAC) (Figura 58) (Sarmah & Sabadie, 2002).

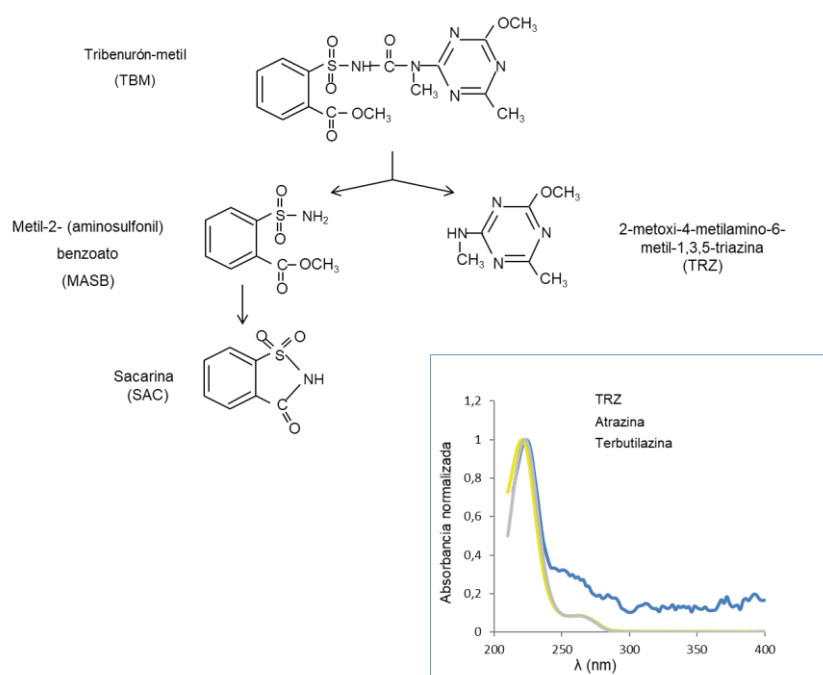


Figura 58. Mecanismo de degradación del TBM y espectro de absorción normalizado del pico identificado como TRZ (azul) y las triazinas atrazina (amarillo) y terbutilazina (gris).

Bajo las condiciones cromatográficas seleccionadas (Sección 3.5.1), el tiempo de retención del pesticida TBM fue de 8.1 min mientras que para los productos de degradación MASB y SAC fue de 7.1 min y 3.5 min, respectivamente. Cabe destacar que con el método propuesto la SAC solo pudo ser detectada si se encontraba a un nivel de concentración igual o superior a $500 \mu\text{g L}^{-1}$, valor demasiado alto para lo que se esperaría en muestras de agua ambientales. Por tanto este compuesto no se incluyó en los siguientes estudios. Por otro lado, en las muestras degradadas se observó un pico adicional a 6.6 min, el cual se identificó como el producto de degradación triazínico (TRZ). A pesar de no existir patrones comerciales de este producto, lo que imposibilitó su cuantificación, la aparición de este pico es consistente con resultados descritos anteriormente (Bossi, Vejrup & Jacobsen, 1999). Como se puede observar en la Figura 58, existe una buena correlación entre el espectro de absorción del pico sospechoso de ser TRZ (6.4 min) y el espectro de otras triazinas como la terbutilazina. Esta coincidencia hizo pensar que el pico correspondía a una molécula con una estructura similar a una triazina, lo que avaló que dicho pico era TRZ.

En la Tabla 39 se muestran los parámetros analíticos obtenidos para el TBM y el MASB, medidos a 230 nm y empleando como fase de extracción dos capilares recubiertos de TEOS-MTEOS modificados, uno con NPs de TiO_2 y otro con NPs de CuO (Figura 55). Como se observa en esta tabla, se obtuvo una linealidad y precisión satisfactoria para ambos compuestos. Los LODs alcanzados fueron 0.25 y $1.5 \mu\text{g L}^{-1}$ para TBM y MASB, respectivamente. Teniendo en cuenta las concentraciones máximas de sulfonilureas encontradas en muestras de agua de uso agrícola o ríos próximos a áreas agrícolas ($< 200 \text{ ng L}^{-1}$) (Pei, Zhu & Huang, 2018; Sarmah et al., 2002; Hijosa-Valsero et al., 2016), y considerando que cabe esperar el mismo nivel de concentración para el TBM, se puede concluir que el método propuesto es adecuado para la determinación de este pesticida en muestras de agua ambiental.

Tabla 39. Parámetros analíticos obtenidos para TBM y MASB con el método IT-SPME-NanoLC-DAD propuesto.

Analito	Recta de calibrado ($y = a + bx$)				LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisión (RSD, %) ^a
	Rango lineal	$a \pm s_a$	$b \pm s_b$	R^2			
TBM	1 - 50	17 ± 30	12.7 ± 0.9	0.998	0.25	1	5
MASB	5 - 100	10 ± 2	2.12 ± 0.03	0.9996	1.5	5	7

a) Establecida para una disolución de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de TBM y $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de MASB, (n=3).

Estudio de la degradación de TBM en condiciones hidrolíticas

En primer lugar se estudió hidrólisis del TBM en condiciones de laboratorio. Para ello, se expusieron a condiciones ambientales (oscuridad y luz solar, y a temperatura ambiente) diferentes viales de vidrio conteniendo disoluciones patrón de TBM de concentración $10 \mu\text{g L}^{-1}$ y $50 \mu\text{g L}^{-1}$. El seguimiento de la degradación se realizó tomando pequeñas porciones de estas disoluciones y analizandolas inmediatamente con el sistema IT-SPME-NanoLC-DAD propuesto.

En la Figura 59A se muestran los cromatogramas obtenidos para una disolución de TBM de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ expuesta durante diferentes tiempos a la luz solar. En el cromatograma correspondiente a la disolución recién preparada únicamente se observó el pico del TBM. Después de 4 días de exposición se pudieron observar dos picos adicionales, correspondientes al MASB y a la TRZ, respectivamente, así como la disminución del pico del TBM. El pico atribuido al MASB se detectó hasta los 14 días, siendo después su concentración inferior al LOD; esto sugiere que este producto de degradación también se degrada rápidamente. El pico correspondiente a la TRZ pudo detectarse durante mucho más tiempo que el TBM. Para la disolución de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ solo se detectaron los picos de TBM y de TRZ. Como era de esperar, la SAC no fue detectada en ninguna de las disoluciones ensayadas.

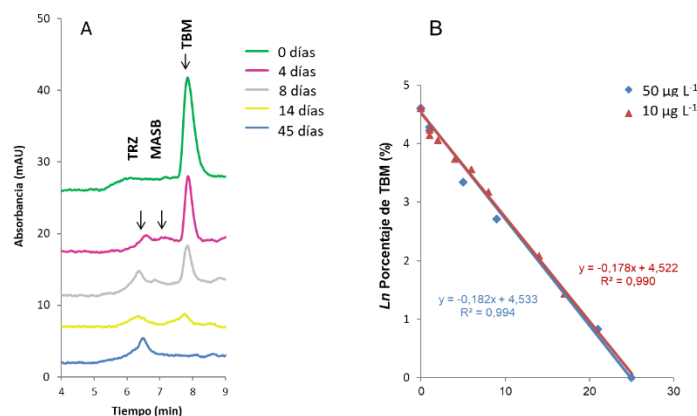


Figura 59. A) Cromatogramas obtenidos a 230 nm para una disolución de TBM ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) expuesta a condiciones de laboratorio durante diferentes días; B) representación del Ln del porcentaje de TBM no degradado frente al tiempo de exposición para dos disoluciones patrón de TBM de concentración $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (azul) y $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (rojo).

La representación del Ln de la concentración de TBM no degradado frente al tiempo de exposición mostró que la degradación de este pesticida sigue una cinética de primer orden (Figura 59B). La vida media ($t_{1/2}$) estimada para dos disoluciones de concentración 10 y $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de herbicida, expuestas a las mismas condiciones ambientales, fue 3.4 y 3.2 días, respectivamente. Sin embargo, para disoluciones de la misma concentración preparadas con 6 meses de diferencia, el $t_{1/2}$ obtenido varió entre 1.15 y 3.4 días, probablemente debido a la diferencia en las horas de luz solar y la temperatura a lo largo del año en las condiciones del laboratorio.

Estudio del efecto de la radiación UV

Seguidamente, se evaluó el efecto de la radiación UV sobre la degradación del TBM, exponiendo para ello diferentes disoluciones patrón de herbicida a la radiación de una lámpara UV. Con este fin se utilizó el sistema descrito en la Sección 3.5.2, el cual consiste en una bomba peristáltica que porta la disolución de analito por un tubo de tereftalato de polietileno (PET) enrollado sobre una lámpara UV.

En la Figura 60A se muestran, a modo de ejemplo, los cromatogramas obtenidos a diferentes tiempos de exposición. Como era de esperar, el TBM se degrada rápidamente cuando se somete a la radiación UV. Cuando la bomba no se paraba y la disolución solo era irradiada mientras atravesaba el fotoreactor, sólo se detectó el 78 % del TBM. El tiempo que tardaba la disolución en atravesar el sistema (1.2 min) se determinó previamente empleando un compuesto coloreado. Para tiempos de exposición superiores a los 25 min la concentración de TBM fue inferior al LOD del método ($0.25 \mu\text{g L}^{-1}$).

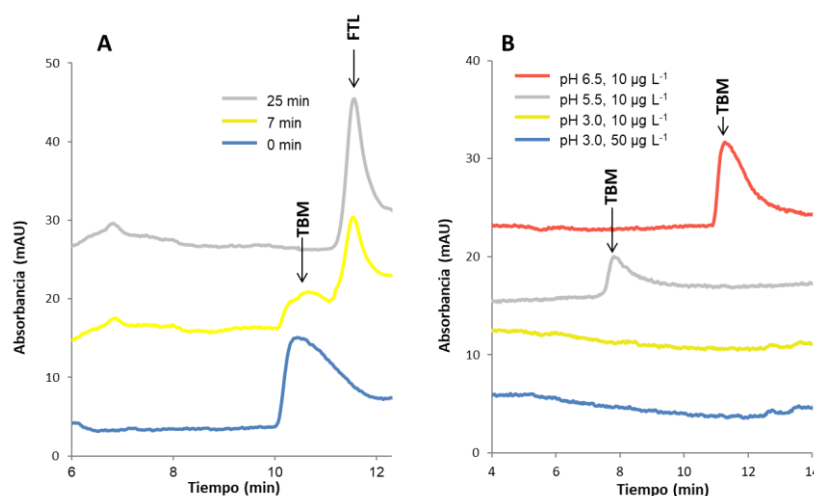


Figura 60. Cromatogramas obtenidos a 230 nm para A) una disolución de TBM ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) después de ser expuesta a radiación UV; B) una disolución de TBM de concentración $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ preparada en agua nanopura a pH 6.5, 5.3 y 3.0 y para otra disolución de concentración $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ a pH 3.

La representación del Ln de la concentración de TBM no degradado frente al tiempo de exposición a la radiación UV indicó que la degradación también se ajustaba a una cinética de primer orden, siendo en este caso $t_{1/2} = 5.5$ min. Cabe destacar que, de los productos de degradación, solo se detectó el compuesto triazinico, lo cual sugiere que el MASB también se degrada rápidamente cuando se expone a la radiación UV. Bajo las mismas condiciones, se estudió la degradación del MASB, concluyendo que su $t_{1/2}$ era de 4.9 min. Cabe destacar que el pico adicional observado a 11.5 min (Figura 60a) se debe a la presencia de un fthalato (indicado como FTL en la figura) proveniente de la irradiación del tubo PET (Jornet-Martínez et al., 2014).

Estudio del efecto del pH

Por otro lado se estudió la influencia del pH en la degradación del TBM. Para ello se acidificaron diferentes disoluciones patrón a diferentes pHs con HCl 0.02 M y se analizaron inmediatamente con el método propuesto. En la Figura 60B, se muestran algunos de los cromatogramas obtenidos en este estudio. Como se puede observar, la señal analítica del TBM decrecía drásticamente cuando se acidificaba el medio. A pH = 3 no se observó el pico del TBM, incluso para una disolución de concentración de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de herbicida. Cabe destacar que tampoco se observó ninguno de los productos de degradación del TBM a pH ácido. La degradación del TBM en medio ácido ya ha sido descrita por otros autores, pero utilizando disoluciones de TBM mucho más elevadas que la utilizada en el presente estudio ($5000 \mu\text{g L}^{-1}$) (Bottaro et al., 2008).

Es interesante remarcar que muchos de los procedimientos de SPE descritos en la literatura requieren de un ajuste del pH para lograr una buena recuperación (Pei et al., 2018; Dong, Qian & Hu, 2015; Tang et al., 2014). Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que a las concentraciones ensayadas la acidificación de la muestra supone la degradación del TBM aumentando el riesgo de falsos negativos o una estimación por debajo de la concentración real de este herbicida.

Estudio de la degradación en aguas ambientales

Finalmente, el método propuesto se empleó para estudiar la degradación del herbicida TBM en diferentes tipos de agua ambientales como agua de mar, río, transición y acequia. Previamente al estudio, las muestras fueron caracterizadas midiendo diferentes parámetros fisicoquímicos. En la Tabla 40, se muestran los parámetros medidos y los resultados obtenidos para cada muestra.

Tabla 40. *Parámetros fisicoquímicos de las muestras estudiadas.*

Tipo de agua	pH	Conductividad (mS cm ⁻²)	DQO (mg O ₂ L ⁻¹)	Turbidez (NTU)	t _{1/2} ^a (días)
Mar	7.7	49.8	1.7	3.8	118 ^a
Transición	7.4	15.6	4.7	38.7	63 ^a
Río	7.4	0.96	1.2	0.9	81 ^a
Acequia	7.9	1.25	6.5	2.9	14.3
Nanopura	7.6	0.004	0.4	0.06	1.15

a) valores calculados como la suma de las dos etapas.

Las muestras, previamente analizadas con el procedimiento propuesto para verificar la ausencia de TBM, fueron fortificadas con 50 µg L⁻¹ de herbicida y expuestas en viales de vidrio a las condiciones ambientales. También se incluyó en el estudio una muestra de agua nanopura. Las diferentes muestras fortificadas se analizaron simultáneamente, de manera que todas las disoluciones habían sido expuestas a las mismas condiciones (horas de luz, temperatura...). El estudio se realizó monitorizando la variación de la concentración de TBM a lo largo de 22-30 días, o hasta 45 días en el caso del agua de mar. Para ello, se extrajeron periódicamente proporciones de muestra que inmediatamente se procesaron por el sistema IT-SPME-NanoLC-DAD. Cabe destacar que en este estudio no se consideró la pérdida del analito por volatilización, ya que este proceso es despreciable para este tipo de compuestos a temperatura ambiente (Sarmah et al., 2002).

En la Figura 61 se muestran los cromatogramas obtenidos a lo largo de este estudio para algunas de las muestras. Como se puede observar, el perfil cromatográfico es diferente para los distintos tipos de muestra. Por ejemplo, para la muestra de agua de acequia se obtuvo un perfil cromatográfico con más picos en la zona de 1.5 a 11 min, que para el agua de mar. Esto puede ser debido a una mayor presencia de compuestos polares, los cuales quedan poco retenidos en la fase estacionaria y son eluidos rápidamente. A pesar de ello, estos picos no interferían en la identificación y cuantificación del TBM, el cual se pudo identificar claramente mediante su espectro de absorción UV, así como medir adecuadamente las áreas de pico. Sin embargo, ninguno de los productos de degradación pudo ser detectado por la presencia de estos compuestos.

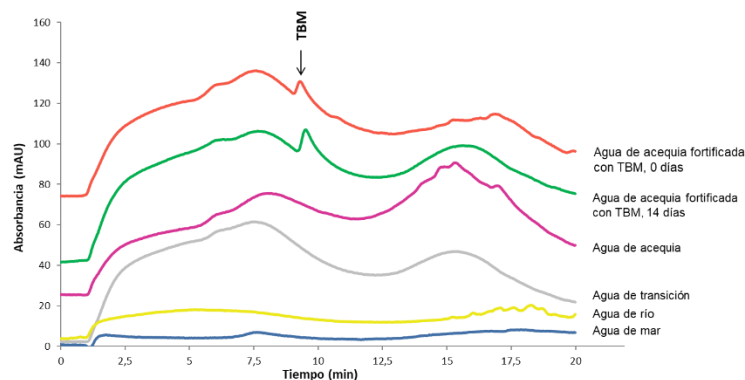


Figura 61. Cromatogramas registrados a 230 nm para diferentes muestras de agua ambientales y agua de acequia fortificada con TBM ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) antes y después de ser expuesta a condiciones de laboratorio durante 14 días.

En la Figura 62 se representa el porcentaje de TBM no degradado en función del tiempo. Como se puede observar, existen diferencias significativas en la degradación del pesticida según el tipo de agua. La degradación del TBM es relativamente más rápida en el agua de acequia y sigue una cinética de primer orden (Tabla 41) con un tiempo de vida medio de 14.3 días. Por contra, el herbicida es relativamente estable en agua de mar, y a los 21 días se había degradado menos del 10 %. Si se considera la variación de la concentración de herbicida a partir de los 21 días, se observa una buena linealidad al representar el Ln del porcentaje de TBM no degradado frente al tiempo de exposición, y por tanto la degradación en agua de mar también sigue una cinética de primer orden (Tabla 41). El tiempo de vida medio obtenido extrapolando los resultados observados en el intervalo de 21 a 45 días es de 97 días (Starner, Kuivilla, Jennings & Moon, 1999) Por tanto, el tiempo necesario para reducir la concentración de TBM a la mitad fue de $21 + 97$ días, si este se encuentra en el agua de mar analizada.

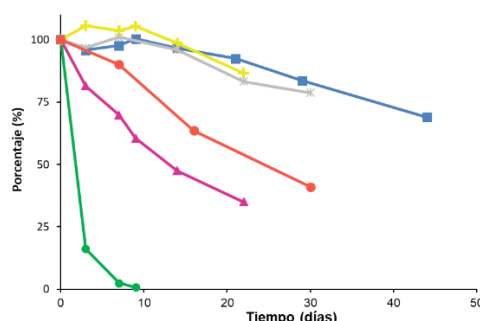


Figura 62. Representación del porcentaje de TBM no degradado frente al tiempo de exposición para diferentes tipos de muestras de agua fortificadas con TBM a un nivel de concentración de $50 \mu\text{g L}^{-1}$.

Una tendencia similar se observó para la degradación del TBM en aguas de río y transición. En ambos casos se observó una degradación en dos etapas. Durante los primeros 14 días para el agua de río y 9 días para el agua de transición, no se observó una variación del porcentaje de TBM. A partir de ese momento empezó a degradarse siguiendo una cinética de primer orden (Tabla 41). Para realizar el estudio comparativo, se calculó el tiempo de vida medio considerando las dos etapas de la degradación ($t_{1/2}'$), es decir, sumando el tiempo de la primera etapa en la que no había degradación y el $t_{1/2}$ calculado según la variación de la concentración de TBM con el tiempo. Este valor se determinó para las muestras de agua de mar, río y transición. Los valores de $t_{1/2}'$ se muestran en la Tabla 40.

Tabla 41. Resultados obtenidos del estudio de degradación de TBM en aguas ambientales.

Tipo de agua	Tiempo ^a (días)	Regresión lineal ^b ($y = a + bx$)			$t_{1/2}$ (días)
		a	b	R ²	
Mar	21 - 44	4.8078	-0.0129	0.99	97 ^b
Transición	9 - 22	4.8119	-0.0165	0.99	54 ^b
Acequia	0 - 22	4.5477	-0.0445	0.98	14.3
Río	14 - 30	4.7027	-0.0121	0.96	67 ^b
Nanopura	0 - 14	4.5264	-0.5308	0.997	1.15
Río + nanopura (4:1) ^c	0 - 35	4.6418	-0.0204	0.98	35.8
Río + nanopura (10:1) ^c	0 - 30	4.6729	-0.3160	0.98	24.1

a) Intervalo de tiempo con cinética de primer orden. b) Valores calculados sin considerar el tiempo inicial donde el TBM no se degrada c) v/v

Es interesante destacar que, bajo las mismas condiciones, el TBM se degradó mucho más rápido en agua nanopura ($t_{1/2} = 1.2$ días) que en el resto de aguas. Con el fin de evaluar el efecto del agua nanopura se realizaron ensayos adicionales fortificando con TBM dos mezclas de agua de río y agua nanopura en las proporciones 1:4 y 1:10 (v/v), y monitorizando la variación de la concentración de TBM con el tiempo. Los resultados obtenidos mostraron que en presencia de agua nanopura se acelera la degradación del TBM. En ambos casos, la degradación tiene lugar siguiendo una cinética de primer orden, con $t_{1/2} = 25.2$ días y 19.1 días para la mezcla 1:4 (Figura 62) y 1:10, respectivamente. Esto confirma que la degradación de TBM en agua nanopura es mucho más rápida que en las otras matrices estudiadas. Similares resultados observaron Bottaro y colaboradores al estudiar la degradación de TBM en agua nanopura y agua procedente del cultivo de arroz, cuando se sometían a radiación UV (Bottaro et al., 2008).

La degradación de un pesticida en aguas ambientales está afectada por muchas variables como la temperatura, el pH, la radiación UV, la presencia de microorganismos y nutrientes u otros parámetros químicos (Sarmah et al., 2002). En este estudio, el pH de las muestras era prácticamente el mismo (Tabla 40) y todas las muestras fueron expuestas a idénticas condiciones ambientales (radiación UV y temperatura). Por tanto, las variaciones observadas en la velocidad de degradación del TBM probablemente se debían a la presencia de microorganismos y a la composición química de las muestras estudiadas.

Como se puede observar en la Tabla 40, la estimación de $t_{1/2}'$ no está relacionada con un único parámetro fisicoquímico, sino que más bien se debe a la suma de diferentes variables. Aparentemente, en las aguas naturales un alto valor de la DQO está inversamente relacionado con el tiempo de vida medio observándose un $t_{1/2}$ mucho más alto en el agua de mar que en el agua de río o acequia. Ello puede ser debido a que en este tipo de muestras existe una elevada cantidad de ácido húmico que actúa absorbiendo la radiación UV (Lartigues & Garrigues, 1995). Por otro lado, teniendo en cuenta el log Kow del TBM, cabe esperar una baja absorción del herbicida en las partículas presentes en las muestras. Esto puede explicar que se obtengan similares $t_{1/2}$, en dos muestras con diferente cantidad de partículas como son el agua de transición y el agua de río.

Además, diferentes estudios han concluido que la degradación de los pesticidas en ecosistemas hídricos pequeños como acequias es mucho más rápida que en ecosistemas más grandes, a causa de la actividad microbológica (Mukherjee, Das, Kumar, Satkàr & Sharma, 2015). Estas conclusiones están de acuerdo con los resultados obtenidos a lo largo del estudio realizado. Sin embargo, otros parámetros relacionados con la composición química de la muestra (nutrientes e iones) y la posible biotransformación, deberían ser considerados en un estudio más exhaustivo.

Conclusiones

Los resultados de este apartado muestran que la preservación de la integridad química de la muestra es esencial para obtener resultados fiables en la determinación del herbicida TBM en muestras de aguas ambientales. El método propuesto basado en IT-SPME-NanoLC-DAD es una buena opción para el análisis de TBM en este tipo de muestras, ya que solo se requiere de filtración antes de ser procesada por el sistema de extracción. Además, la linealidad y la precisión obtenidas son satisfactorias, y los LODs son comparables a los obtenidos por otros procedimientos para la determinación de sulfonilureas, cuyo enfoque se basa en SPE.

Diferentes estudios que han abordado la degradación del TBM en suelos y cultivos han concluido que, como la mayoría de pesticidas modernos, el TBM se degrada rápidamente. Por ejemplo, se ha reportado que el $t_{1/2}$ en suelos varía de 1.3 a 7.9 días, mientras que es menor de 4 días en cultivos (Dong et al., 2015; Mukherjee et al., 2015). Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que, a diferencia de los que ocurre en suelos y cultivos, el TBM no se degrada tan rápidamente en las aguas ambientales, siendo estable durante algunas semanas. Las diferencias encontradas en el $t_{1/2}$ según el tipo de agua puede deberse a la actividad microbológica. Cabe destacar que el TBM se degrada mucho más rápido en agua nanopura.

Finalmente, contrariamente a lo que cabría esperar, los resultados obtenidos permiten concluir que no es necesario analizar las muestras inmediatamente después de ser tomadas, siempre y cuando estas se conserven protegidas de la luz UV. Por otro lado, para obtener resultados precisos las disoluciones patrón deben ser preparadas cada día o, alternativamente, utilizar otro tipo de agua diferente al agua nanopura, preferiblemente agua de mar.

4.2.2.5 Medida no invasiva del contenido en clorofila a para la evaluación de la influencia de la acción de pesticidas en plantas

Se estudió la salud de plantas tratadas con los pesticidas terbutilazina, trifluralín y clorpirifós. Para ello se desarrolló un procedimiento no invasivo que permite monitorizar el contenido de clorofila a. El método se basa en la obtención del espectro de absorción mediante reflectancia difusa medido directamente en las hojas, y el posterior tratamiento de los datos mediante el método HPCIM. El contenido de clorofila a está estrechamente relacionado con el estado de salud de la planta. En primer lugar se ha optimizado el método analítico y posteriormente se ha empleado para monitorizar la salud de las plantas cuando éstas son tratadas con los diferentes pesticidas.

Respuesta de la absorción de clorofila a

Para la determinación de clorofila a en muestras sólidas mediante reflectancia difusa se prepararon patrones inmovilizando la clorofila a en soportes de nylon. Para ello, se hizo pasar con una jeringa de vidrio 1 mL de disolución patrón de clorofila a (de 5 a 20 mg mL⁻¹) por un filtro de nylon (13 mm d.i. y 0.2 µm de tamaño de poro) empleando un portafiltros de acero de 13 mm de diámetro. Cabe destacar que la clorofila se queda mayoritariamente inmovilizada en el soporte de nylon, como se deduce del hecho de que al pasar la disolución por el filtro de nylon la disolución quedaba incolora.

La Figura 63 muestra los espectros de absorción, medidos como reflectancia difusa, de los patrones sólidos de clorofila a y la imagen de éstos. Como puede observarse, el espectro tiene dos máximos a 420 y 665 nm. La intensidad de la absorbancia, al igual que el color verde de los filtros, variaba en función de la concentración de clorofila a inmovilizada en el filtro.

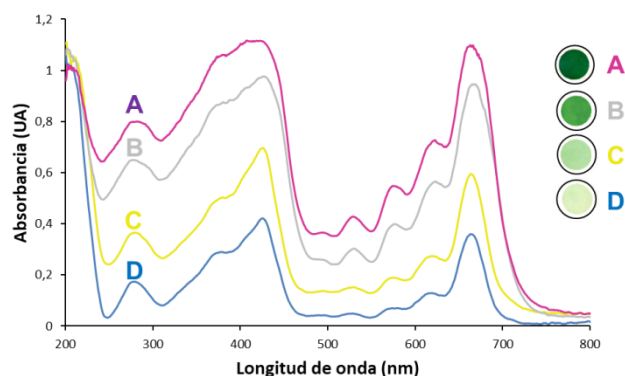


Figura 63. Espectro de absorción de los soportes de nylon con diferente concentración de clorofila a retenida. A) 314 mg m^{-2} , B) 236 mg m^{-2} , C) 157 mg mL^{-2} y D) 79 mg m^{-2} .

Para la cuantificación del contenido de clorofila a en los soportes de nylon o en superficies de hojas se expresó su concentración en mg m^{-2} , representando la intensidad de absorbancia a la longitud de onda de medida respecto a la cantidad de clorofila a inmovilizada. Para calcular la cantidad de clorofila a presente en los patrones se dividió la masa de clorofila a procesada en Kg entre el área del filtro de nylon en m^2 . Se observó una relación lineal entre la absorbancia y la concentración de analito en el rango de concentraciones de clorofila a, que fue de 79 a 314 mg m^{-2} , siendo la concentración más baja el LOQ. En la Tabla 42 se muestran los parámetros analíticos de las rectas de calibrado para la cuantificación de clorofila a inmovilizada en los soportes de nylon a tres longitudes de onda diferentes. El LOD resultó ser 24 mg m^{-2} en todas las longitudes de onda utilizadas.

Tabla 42. Rectas de calibrado para la cuantificación de clorofila a inmovilizada en los soportes de nylon (calibrado de 4 puntos).

Longitud de onda (nm)	Parámetros analíticos ($y = a + b x$)		
	$a \pm S_a$	$b \pm S_b$	R^2
420	$(20 \pm 6) 10^{-2}$	$(31 \pm 4) 10^{-4}$	0.9830
620	$(-90 \pm 60) 10^{-3}$	$(25 \pm 3) 10^{-4}$	0.9744
665	$(90 \pm 80) 10^{-3}$	$(29 \pm 3) 10^{-4}$	0.9707

Representatividad de las medidas

En este trabajo se evaluó la viabilidad de cuantificar el contenido de clorofila a en las hojas de plantas mediante la obtención directa del espectro de absorción de la hoja. Dada la posible heterogeneidad de la muestra fue necesario evaluar si la medida era representativa o dependía de la sección de la hoja donde se realizaba la medida. Para estudiar la representatividad de la medida se registraron los espectros de absorción en 20 partes diferentes de una hoja de espinaca.

La Tabla 43 muestra el valor de absorción y la RSD a las tres longitudes de onda seleccionadas. Como se puede observar, la precisión obtenida a las longitudes de onda de interés está de acuerdo con la precisión esperada para la técnica, por lo que se concluyó que no existían diferencias significativas en los resultados al variar el punto de la hoja donde se realizaba la medida.

Tabla 43. Valores promedios de absorción y RSD tomados en diferentes puntos de la misma hoja de espinaca ($n = 20$).

Longitud de onda (nm)	$\bar{x} \pm s$	RSD (%)
420	1.01 ± 0.05	4.5
620	0.82 ± 0.04	4.4
665	1.06 ± 0.04	4.2

Optimización de los parámetros del método HPCIM

En método HPCIM, desarrollado por el grupo de investigación MINTOTA (Bosch-Reig & Campíns-Falcó, 1998), permite estimar la concentración de un analito en presencia de sustancias interferentes conocidas o desconocidas mediante tratamiento matemático del registro de la muestra y de diferentes disoluciones patrón.

El método se basa en la selección de una longitud de onda arbitraria del espectro del analito (conocido) la cual se define como longitud de onda de referencia. De esta manera se puede calcular el espectro de la interferencia como una función de la absorbancia a la longitud de onda de referencia (conocida).

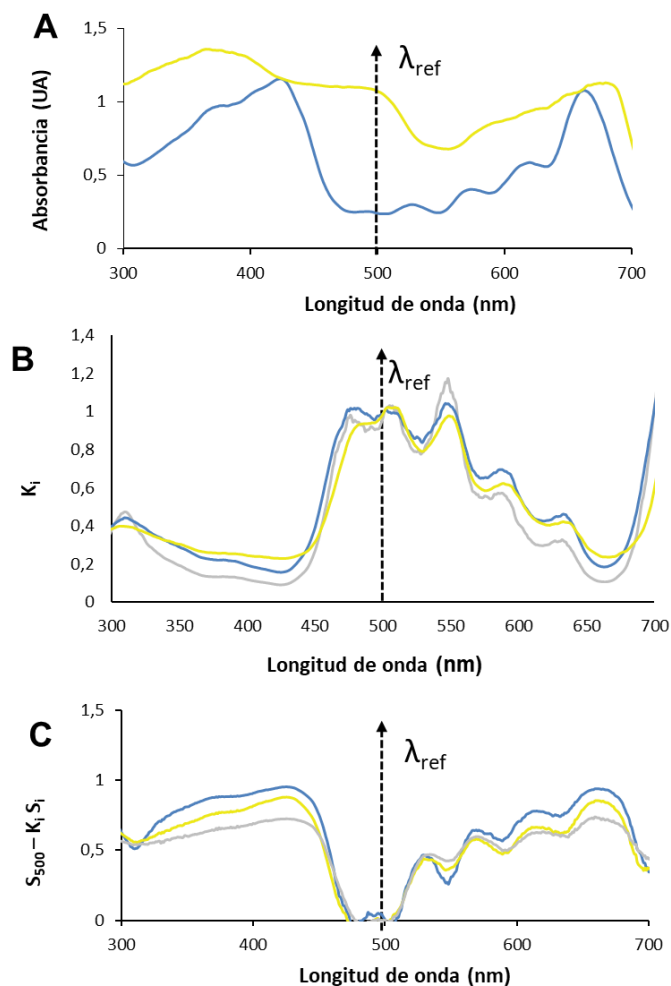


Figura 64. A) espectro de reflectancia difusa para la muestra (amarillo) y el analito a la concentración máxima posible (azul); B) K_i calculada para tres disoluciones patrón de clorofila a (79, 157 y 314 mg m⁻²); C) Gráfico $S_{500} - K_i S_1$ frente a la longitud de onda λ , para los K_i calculados en B.

Supóngase una mezcla de los componentes X e Y, donde X es la muestra e Y una sustancia interferente desconocida, cuyos espectros para X y mezcla se muestran en la Figura 64A. La absorbancia de la muestra a cualquier longitud de onda se puede expresar como:

$$S_i = x_i + y_i \quad i \in [\lambda_1, \lambda_n] \quad (1)$$

donde S_i , x_i e y_i son la señal a la longitud de onda i de la muestra, del analito y de los interferentes, respectivamente.

Por otro lado, para un compuesto puro, la relación de la señal entre dos longitudes de onda es constante. Una vez seleccionada la longitud de onda de referencia se puede definir la K_i como:

$$K_i = \frac{x_{ref}}{x_i} \quad i \in [\lambda_1, \lambda_n] \quad (2)$$

donde x_{ref} es la absorbancia del analito puro a la longitud de onda de referencia.

La contribución del analito a la señal de la mezcla puede ser eliminada si se resta $S_{ref} - K_i S_i$:

$$S_{ref} - K_i S_i = x_{ref} + y_{ref} - k_i(x_i + y_i) \quad i \in [\lambda_1, \lambda_n] \quad (3)$$

donde S_{ref} es la absorbancia de la muestra a la longitud de onda de referencia.

Reordenando la ecuación 3, se obtiene:

$$S_{ref} - K_i S_i = y_{ref} - k_i y_i \quad i \in [\lambda_1, \lambda_n] \quad (4)$$

Teniendo en cuenta que a partir del espectro del analito puro se puede determinar K_i , y S_i a partir del espectro de muestra, se puede calcular para todas las longitudes de onda el valor de $S_{ref} - K_i S_i$. De esta manera el resultado obtenido únicamente se relaciona con la señal de la interferencia, puesto que se elimina la contribución del analito. La ecuación anterior se puede expresar como:

$$y_i = \frac{S_{ref} - K_i S_i - y_{ref}}{-K_i} \quad i \in [\lambda_1, \lambda_n] \quad (5)$$

La Ecuación 5 demuestra que se puede calcular la señal de los interferentes a cualquier longitud de onda a partir de la y_{ref} . Cabe destacar que el resto de variables de la Ecuación 5 son conocidas puesto que se deducen a partir del espectro de absorción del analito puro.

El siguiente paso es estimar el valor de y_{ref} . Para seleccionar la longitud de onda de referencia más adecuada se tiene que tener en cuenta que a dicha longitud de onda la absorbancia del espectro interferente no debe ser superior a la absorbancia de la muestra (Figura 64A), y que el valor mínimo es la absorbancia de la muestra menos la del analito a la concentración máxima permitida (Figura 65 E). Diferentes espectros de interferencia pueden ser obtenidos a partir de la Ecuación 5, según el rango descrito por la absorbancia máxima y mínima previamente seleccionadas, y variando y_{ref} dentro de este rango se producen diferencias significativas en los espectros (Figura 65). Por tanto, no se puede predecir el espectro real correspondiente a las sustancias interferentes.

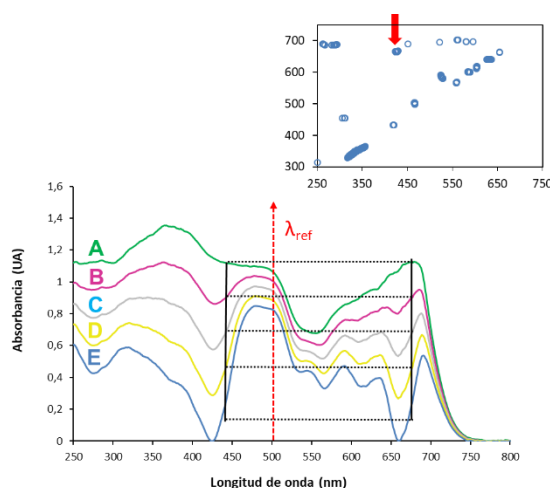


Figura 65. Algunos espectros de interferencias desconocidas (A, muestra; E, muestra menos analito a la máxima concentración permitida; y_{ref} entre 1.05 y 0.8 ua). Localización del par de longitudes de onda con la misma señal independientemente de las condiciones.

Para calcular la absorbancia de las interferencias a la longitud de onda de referencia es necesario encontrar un par de longitudes de onda con la misma absorbancia, independientemente de las variaciones observadas en el espectro interferente según la y_{ref} seleccionada. Por ejemplo, si para todos los espectros interferencia se cumple que $y_5 = y_8$, se puede escribir:

$$\begin{aligned} S_{ref} - K_5 S_5 &= y_{ref} - k_5 y_5 \\ S_{ref} - K_8 S_8 &= y_{ref} - k_8 y_8 \end{aligned} \quad (6)$$

obteniéndose tres ecuaciones con tres incógnitas que permiten calcular el valor de y_{ref} con la ecuación:

$$y_{ref} = S_{ref} - K_5 S_5 + \frac{K_5[(S_{ref} - K_5 S_5) - (S_{ref} - K_8 S_8)]}{K_8 - K_5} \quad (7)$$

Por tanto, es posible a partir del espectro de la muestra estimar el espectro del analito y de las interferencias.

En la Figura 64C se comparan los espectros de absorción de una hoja de espinaca y de un patrón con la máxima cantidad de clorofila que cabe esperar en la muestra. Como se puede observar en la Figura 64B, cualquier concentración de clorofila a es adecuada para calcular los valores de K_i . A partir del espectro de la muestra se obtienen los valores de $S_{ref} - K_i S_i$ (Figura 64C). En este caso se seleccionó 500 nm como longitud de onda de referencia porque la señal de la clorofila a es menor, y por la gran diferencia entre la señal de la muestra y la señal de la clorofila a en el patrón de mayor concentración.

Para seleccionar el par de longitudes de onda de trabajo se obtuvieron diferentes espectros interferencia (Figura 65). Como se puede observar se pueden seleccionar gran cantidad de pares de longitudes de onda para calcular y_{ref} . En este caso se seleccionó el par de longitudes de onda 420 nm y 665 nm, para calcular el espectro interferente y de la clorofila a aplicando la Ecuación 7. En la Figura 66, se muestran el espectro de una muestra de hoja de espinaca y el espectro interferencia y de clorofila a obtenidos aplicando el método HPCIM.

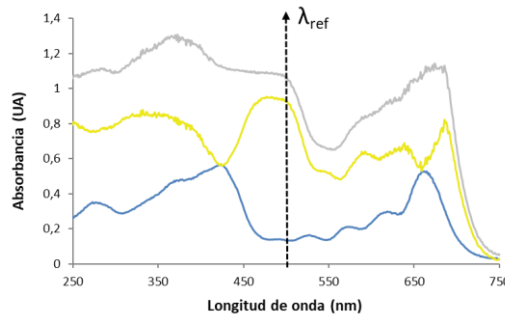


Figura 66. Espectros para una muestra de hoja de espinaca antes y después de aplicar el método HPCIM. Muestra directa (gris), interferente (amarillo) y clorofila a en la muestra (azul).

Validación de la exactitud del método HPCIM

Con el fin de validar el método basado en el método HPCIM, se compararon los resultados obtenidos al aplicar el procedimiento propuesto y un método de referencia descrito en bibliografía para la cuantificación de clorofila a en hojas de espinacas. Como método de referencia se seleccionó el procedimiento descrito por Hu y colaboradores (Hu et al., 2013). Se trata de un procedimiento invasivo que destruye la muestra, ya que se basa en la extracción de la clorofila a con acetona, y posteriormente se determina por espectroscopía de absorción molecular. Se substituyó la acetona por etanol para minimizar la evaporación del disolvente.

Primeramente se aplicó el método HPCIM, ya que se trata de un procedimiento no invasivo. Para aplicar este método únicamente se requirió registrar el espectro de absorción por reflectancia difusa de diferentes secciones de hojas de espinacas de área conocida. Seguidamente se analizaron las mismas muestras con el método de referencia. Para ello, en primer lugar, se molturaron en un mortero las hojas de espinacas y se añadieron 2 mL de etanol. Transcurridos 2 min el etanol se transfirió a un matraz aforado de 10 mL. El proceso de extracción se realizó dos veces más, la primera con las mismas condiciones que la extracción anterior y la última añadiendo solo 1 mL de etanol durante 1 min. Los extractos de etanol obtenidos en cada etapa de extracción se combinaron en un matraz aforado, llevado a volumen con agua nanopura. Finalmente, se obtuvieron los espectros de absorción UV-vis de una dilución 1:3 de la disolución de extractos en agua nanopura.

Los espectros de absorción obtenidos para dos muestras de hojas de espinacas se muestran en la Figura 67. Como puede verse, en la región del ultravioleta aparecen gran cantidad de picos debidos a otros compuestos que contiene la muestra y que también son extraídos por el etanol. En cambio, en la zona de 600-700 nm solo aparece un pico que también aparece al medir patrones de clorofila a, y cuya intensidad responde a su concentración. Por tanto, se eligió este pico para la cuantificación de la clorofila en los extractos.

Los parámetros analíticos obtenidos fueron: $y = (28 \pm 25) 10^{-3} + (410 \pm 10) 10^{-4}$ [clorofila a] (mg L^{-1}), $R^2=0.9988$, $\text{LOD}= 1.5 \text{ mg L}^{-1}$ y $\text{LOQ}= 5 \text{ mg L}^{-1}$. La cantidad de clorofila obtenida para varias muestras de hoja de espinacas ($n = 5$) fue $(160 \pm 40) \text{ mg m}^{-2}$.

La cantidad de clorofila a obtenida para las mismas muestras por el procedimiento HPCIM propuesto fue $(144 \pm 6) \text{ mg m}^{-2}$. Los resultados obtenidos por ambos procedimientos son significativamente equivalentes a un nivel de confianza del 95 % ($t = 0.919$, $p = 0.407$). Hay que señalar que el resultado proporcionado por el método HPCIM es más preciso debido a la poca manipulación experimental que requiere.

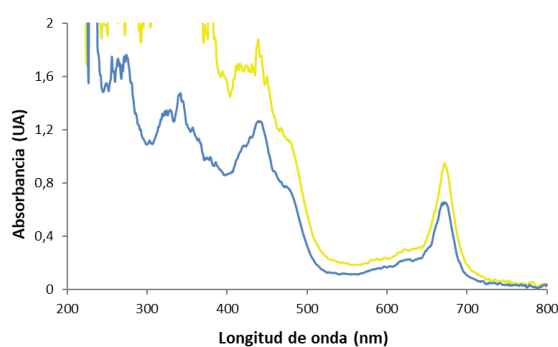


Figura 67. Espectro de absorción de los extractos de etanol para dos hojas de espinacas diferentes.

Determinación de clorofila a como indicador de estrés en plantas por HPCIM

Se utilizó el método HPCIM para monitorizar la variación de la cantidad de clorofila a en plantas de espinacas cuando éstas se trataron con diversos pesticidas. Para realizar el estudio se seleccionaron los herbicidas trifluralina y terbutilazina, y el insecticida clorpirifós. La trifluralina, que pertenece a la familia de las dinitroanilinas actúa sobre el correcto funcionamiento de las raíces (Fernandes et al., 2009). Es decir, las plantas en contacto con trifluralina mueren porque son incapaces de absorber el agua y los nutrientes del suelo. La terbutilazina pertenece a la familia de las triazinas. Como se ha comentado en la Sección 1.6.1.1, este tipo de herbicidas actúa inhibiendo la reacción de Hill e impidiendo la captación de CO₂ durante la fotosíntesis (Cañero et al., 2011). El mecanismo de inhibición consiste en la interrupción del flujo de electrones en el fotosistema II causando la destrucción de la clorofila y los carotenoides. La ausencia de estos compuestos causa clorosis y la formación de radicales libres, los cuales destruyen la membrana celular y generan necrosis (Suresh Kumar et al., 2014). El clorpirifós es un compuesto organofosforado que actúa inhibiendo la acetilcolinesterasa y además, diferentes estudios concluyen que se trata de un pesticida fitotóxico que afecta al crecimiento de algunas especies de plantas (Fernandes, Figueira, Tauler & Bedia, 2018). Para realizar el estudio se tomaron 6 plantas de espinacas de tamaño parecido y se emparejaron dos a dos. De cada pareja, una de las plantas fue rociada con agua y la otra con una disolución conteniendo 1 mg L⁻¹ de pesticida.

Los resultados obtenidos muestran que la cantidad de clorofila a en las hojas de planta de espinacas tratadas con pesticida decrecía significativamente con el tiempo. En la Figura 68 se muestran los espectros obtenidos para dos zonas diferentes de la misma hoja después de 21 días de ser tratada con terbutilazina. Al eliminar las interferencias con el método HPCIM, el espectro resultante (Figura 68 espectro azul) corresponde únicamente a la señal de la clorofila a. Al comparar estos espectros se observó que la intensidad del pico a 665 nm era diferente según la zona de medida a diferencia de en las hojas sanas. Esto puso de manifiesto que el efecto del pesticida no era homogéneo en la planta.

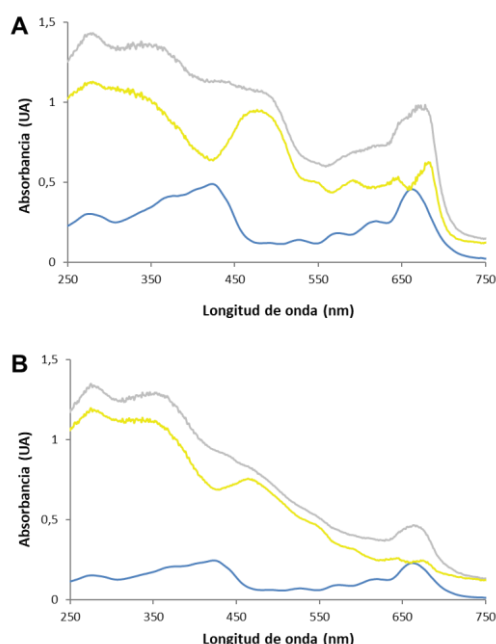


Figura 68. Espectros de absorción de las hojas de espinacas tratadas con terbutilazina antes y después de aplicar el método HPCIM. Muestra medida directamente (gris), interferencia (amarillo) y clorofila a (azul). A) zona de hoja poco afectada, B) zona de hoja más afectada.

En la Tabla 44 se muestran los resultados obtenidos al medir por duplicado el contenido de clorofila a. Con el fin de establecer si los resultados de cada réplica eran comparables, se realizó un análisis por regresión lineal entre los mismos. La recta de regresión obtenida ($y = (-3 \pm 7) + (1.09 \pm 0.07) x$, $R^2 = 0.95$), indica que no hay diferencia significativa entre los resultados obtenidos en cada réplica para un nivel de confianza del 95 %.

Tabla 44. Concentración de clorofila a determinada por el método HPCIM para plantas tratadas con diversos pesticidas. B1 y B2 hojas de planta sin tratar y S1-S6 hojas de planta tratada. Las medidas se realizaron 31 días después del tratamiento con trifluralina y clorpirifós y 21 días después del tratamiento con terbutilazina.

Pesticida	Concentración de clorofila a (mg m ⁻²)			
		Replica 1	Replica 2	Media ± 9 ^a
Trifluralina	B1			
	B2	144.5	133.5	139
	S1	159.7	141.9	151
	S2	77.3	72.2	75
	S3	104.2	97.0	100
	S4	95.5	90.5	93
Clorpirifós	B1	92.8	112.1	102
	B2	140.8	133.5	137
	B3	157.2	142.9	150
	S1	149.3	138.5	144
	S2	95.4	97.5	96
	S3	64.1	62.4	63
	S4	92.0	84.3	88
	S5	109.0	100.0	104
	S6	118.3	106.8	113
Terbutilazina	B1	99.8	104.9	102
	B2	136.1	135.0	136
	S1	131.6	126.4	129
	S2	109.5	95.3	102
	S3	110.5	104.5	107
	S4	52.5	50.7	52

^a incertidumbre expandida k = 2.

Por otra parte, se compararon los resultados obtenidos al aplicar el procedimiento propuesto para la determinación de clorofila a en muestras de hoja de plantas tratadas, con los obtenidos al aplicar los procedimientos no invasivos Macc01 y NDVI. Los resultados obtenidos por cada procedimiento se muestran y comparan en la Figura 69. Como se puede comprobar, los resultados muestran la misma tendencia al aplicar el método HPCIM y el método NDVI. El coeficiente de correlación entre el valor del índice NDVI (x') frente al contenido de clorofila estimado por el procedimiento HPCIM (y') fue $R^2 = 0.79$; este valor es similar al obtenido en otros estudios (Tabla 45). Para un nivel de confianza del 95 %, los resultados obtenidos no son estadísticamente comparables. Por tanto, se concluyó que los resultados proporcionados por los índices de vegetación son una aproximación al contenido de clorofila a.

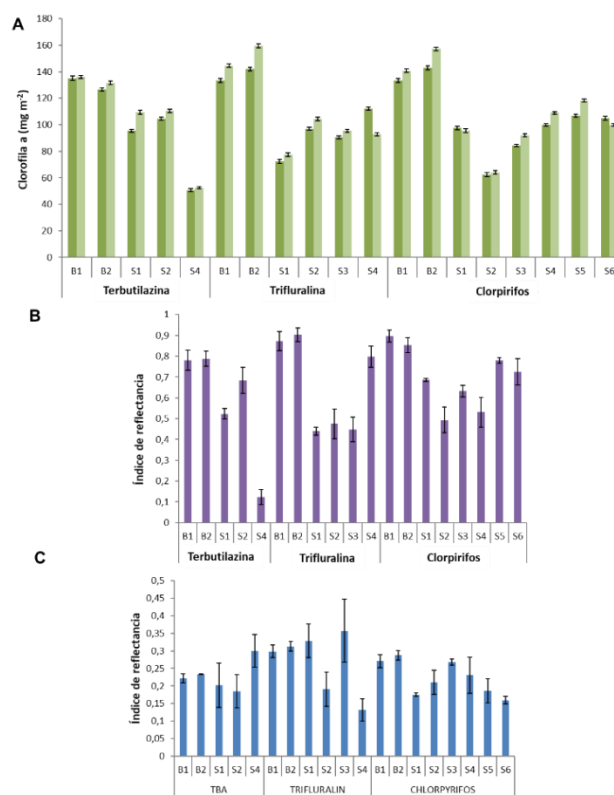


Figura 69. Gráficos del contenido de clorofila a obtenidos por el método HPCIM (A) y del índice de reflectancia obtenido con NDVI (B) y Macc01 (C). Hojas sin tratar (B1 y B2) y tratadas (S1-S6).

En la Tabla 45 se comparan diferentes procedimientos descritos en la literatura para la determinación de clorofila a en la vegetación empleando técnicas invasivas o no invasivas, y con muestreo en línea o fuera de línea. Cabe destacar que los métodos no invasivos y en línea solo son posibles empleando reflectancia difusa.

Tabla 45. Métodos de determinación de clorofila a en muestras vegetales.

Técnica	Aplicación	Muestreo/análisis	Objetivo	Referencia
Cromatografía contra corriente	Aislamiento clorofila a y clorofila b de hojas de espinacas	Invasivo/ off-line	Purificación y separación	Jubert et al., 2017
Reflectancia por satélite	Índices empíricos de vegetación (método Vis)	No invasivo/ en-línea	Contenido clorofila por Vis ^a vs métodos off-line ($R^2 = 0.61-0.80$)	Croft et al., 2014a
Reflectancia	Índice Hiperespectral	No invasivo/ off-line	Estimación de clorofila por índices de vegetación vs métodos off-line ($R^2 = 0.807$)	Sonobe et al., 2017
Reflectancia por satélite	Índices empíricos de vegetación	No invasivo/ en-línea	Disparidad temporal entre el contenido de clorofila y el índice de área ($R^2=0.707$)	Croft et al., 2014b
Reflectancia	Índices empíricos de vegetación	No invasivo/ off-line	Influencia de la enfermedad en el follaje de <i>Eucalyptus globulus</i>	Piertrykowski et al., 2006
Reflectancia por satélite	Índices empíricos de vegetación	No invasivo/ en-línea	Vegetación mínima NDVI	Liu, 2017
Extracción-espectroscopia	Contenido de clorofila	Invasivo/ off-line	Cuantificación: LOQ = 5 mg mL ⁻¹	Hu et al., 2013
Reflectancia	Contenido de clorofila	No invasivo/ off-line	Cuantificación: LOQ = 79 mg m ⁻² Influencia del estrés ($R^2=0.95$)	Procedimiento propuesto

^aVis: índice de vegetación

Conclusiones

Se ha propuesto un procedimiento rápido y no invasivo para la determinación de clorofila a en muestras de hoja de planta mediante la medida directa del espectro de absorción por reflectancia difusa y el tratamiento posterior de la señal con el método HPCIM. Este tratamiento matemático permite aislar la señal de la clorofila a de la del resto de interferentes.

Los resultados obtenidos por el método HPCIM se han comparado con los obtenidos al utilizar un procedimiento invasivo basado en la extracción de clorofila a de las hojas con etanol. Se han obtenido resultados similares con ambos procedimientos, pero la precisión obtenida por el método HPCIM fue mayor, a causa de la menor manipulación experimental. Por ello se propone el método HPCIM para la determinación no invasiva de clorofila a en hojas

Dado que el contenido de clorofila a en las hojas es un indicador del estado de salud de la planta, se ha empleado el método HPCIM para evaluar el estado de diferentes plantas de espinacas tras ser tratadas con pesticidas. También se han estimado los índices de reflectancia NDVI y Macc01 de las plantas tratadas. Los resultados muestran que a pesar que los métodos HPCIM y NDVI muestran la misma tendencia, los indicadores de reflectancia no son capaces de estimar correctamente el contenido real de clorofila a. Sin embargo, el método HPCIM sí es capaz de realizar esta estimación, convirtiéndose en una mejor alternativa para la determinación de los índices de vegetación.

Los resultados obtenidos demuestran que el método HPCIM puede ser una buena herramienta para estimar el contenido real de clorofila a y conocer así el estado de salud de la planta. El método HPCIM propuesto puede ser una herramienta útil para la monitorización remota de vegetación.

4.2.2.6 Estudio de la capacidad de extracción de TEOS-MTEOS modificado con NPs de CuO en HILIC-IT-SPME-NanoLC-DAD para la determinación de triptófano y tirosina

Se ha desarrollado un procedimiento de IT-SPME acoplado a NanoLC-DAD para la determinación de triptófano y tirosina empleando HILIC para la separación cromatográfica de los analitos. Se ha seleccionado una columna ZIC®-HILIC, cuya fase estacionaria consiste en grupos zwitterión tipo sulfobetaina anclados covalentemente a partículas de sílice.

Condiciones cromatográficas

En este trabajo se utilizó como fase móvil una mezcla de acetonitrilo y disolución tampón de acetato de amonio 20 mM de pH 6.8. De los diferentes gradientes estudiados, la mejor resolución cromatográfica se obtuvo con el gradiente descrito en la Sección 3.51. El flujo de fase móvil se incrementó de 0.5 $\mu\text{L min}^{-1}$ a 0.7 $\mu\text{L min}^{-1}$ a lo largo del análisis, a fin de obtener picos más estrechos, y para reducir los tiempos de elución y acondicionamiento de la columna.

Para mejorar el perfil de pico también se optimizó el tiempo que la fase móvil pasa a través de la fase de extracción (tiempo de desorción). En este caso, el tiempo de desorción óptimo fue 2 min. Para tiempos superiores se empeoraba el perfil de los picos cromatográficos y no se observaba un incremento de las áreas. Por otro lado, para tiempos inferiores a 2 min las áreas de pico disminuían.

La precisión en los tiempos de retención también fue estimada procesando por triplicado una disolución patrón con una mezcla de triptófano y tirosina de concentración 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 3 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. La RSD obtenida fue inferior al 1 % para ambos aminoácidos.

Condiciones de la IT-SPME

La selección de la fase de extracción se llevó a cabo teniendo en cuenta la estructura y polaridad de los analitos. Tanto el triptófano como la tirosina son compuestos muy polares ($\log K_{ow} = -1.06$ y -2.26 , respectivamente), y ambos compuestos tienen una estructura aromática. Por ello se seleccionó como fase de extracción para IT-SPME un polímero TEOS-MTEOS modificado con NPs de CuO, de acuerdo a los resultados obtenidos en la Sección 4.2.2.3.

Se optimizó el volumen de muestra procesada por el sistema. Para ello, se ensayaron diferentes volúmenes de una disolución patrón que contenía $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de triptófano y $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de tirosina. En la Figura 70 se muestra la variación de la señal analítica en función del volumen de muestra procesado. Esta figura muestra que para ambos compuestos la mayor señal analítica se obtuvo cuando se procesaron $100 \mu\text{L}$ de muestra; por tanto se seleccionó este valor como el volumen de muestra óptimo.

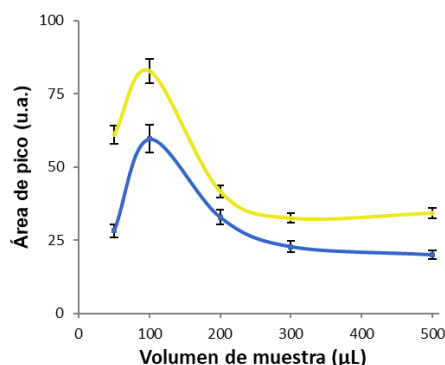


Figura 70. Áreas de pico obtenidas al procesar diferentes volúmenes de disolución patrón de tirosina (azul) y triptófano (amarillo) de concentración $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Parámetros analíticos

Los parámetros analíticos más relevantes se establecieron procesando disoluciones conteniendo una mezcla de ambos aminoácidos. En la Tabla 46, se muestran las ecuaciones de calibrado, y los LODs y LOQs obtenidos para cada analito bajo las condiciones seleccionadas. Los LODs y LOQs se establecieron como en los apartados anteriores. Los resultados fueron satisfactorios en el intervalo de trabajo de 0.3 a 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para el triptófano, y 1 a 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para la tirosina.

Tabla 46. Parámetros analíticos obtenidos mediante el método HILIC-IT-SPME-NanoLC-DAD propuesto.

Analito	Recta de calibrado ($y = a + bx$)			LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Precisión* (RSD %)	
	$a \pm s_a$	$b \pm s_b$	R^2			Intra- día	Inter- día
Triptófano	-21 ± 10	2115 ± 3	0.999	0.1	0.3	2.7	9.2
Tirosina	-30 ± 30	91 ± 6	0.992	0.3	1	3.0	8.0

* n=3

La precisión del método propuesto se expresó como RSD (%) para una disolución patrón que contenía 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de triptófano y 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de tirosina. Como se puede observar en la Tabla 46, la RSD intra-día es menor del 3 % y la RSD inter-día es menor del 9 % (n= 3). Por tanto, se puede considerar que la precisión obtenida es adecuada. Estos resultados indican que el método propuesto es adecuado para la cuantificación de ambos aminoácidos a concentraciones de unos pocos $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Estudio de procedimiento de hidrólisis de la ovoalbúmina

Para estudiar el procedimiento de hidrólisis (Sección 3.3.1) en primer lugar se optimizaron las condiciones para determinar el contenido de esta proteína mediante las técnicas espectroscópicas de absorción y emisión (fluorescencia).

El método de absorción se basa en la medida directa de la absorbancia de las disoluciones de proteína a 280 nm (Chang & Zhang, 2017). Como se puede ver en la Figura 71A, la señal obtenida a 280 nm para una disolución de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ovoalbúmina es idéntica a la obtenida para una disolución que contenía una mezcla triptófano y tirosina a la concentración estequiométrica equivalente a la de proteína. Por tanto, se concluyó que la absorción de la proteína a 280 nm solo dependía de la absorbancia del triptófano y de la tirosina.

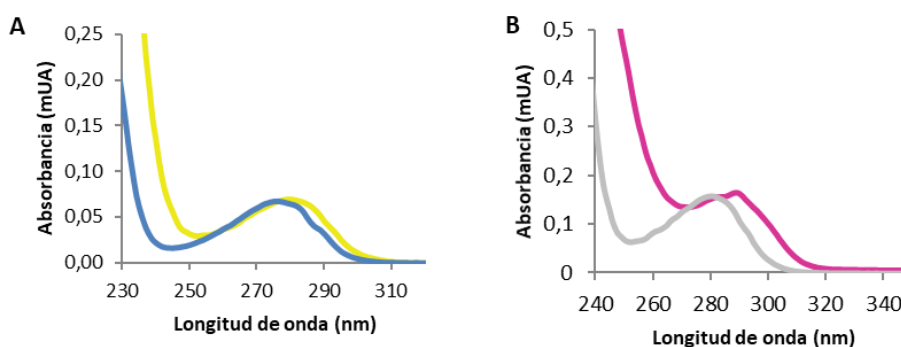


Figura 71. Espectros de absorción de A) una disolución de ovoalbúmina de concentración 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (amarillo) y una mezcla de triptófano y tirosina (azul); B) la misma disolución de ovoalbúmina a pH básico (morado) y neutro (gris).

Por otro lado, se estudió la influencia del pH de la muestra en la respuesta analítica a fin de evaluar su posible incidencia en la medida de la absorbancia, y teniendo en cuenta que el pH de las muestras se encontraba entre 7 y 13. En la Figura 71B, se muestran los espectros de absorción obtenidos para una disolución de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ovoalbúmina a pH 7 y a pH 13. Como se puede observar, en medio básico el máximo de absorción se desplaza hasta los 288 nm, lo que puede ser explicado por los cambios que se producen en la estructura electrónica de los aminoácidos (Miyamoto & Homma, 2018). En medio básico los grupos carboxilo de la proteína se encuentran desprotonados, lo cual incrementa la deslocalización electrónica y el máximo de absorción se desplaza de 280 nm a 288 nm; no obstante, el valor de absorbancia a 280 nm no se modifica (Figura 71B). Por tanto, se concluyó que la señal a 280 nm no se veía sustancialmente afectada por el pH de la muestra.

Se seleccionó 280 nm como la longitud de onda óptima para la determinación de ovoalbúmina observándose un comportamiento lineal de la señal analítica en función de la concentración de proteína en el rango de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. El LOD fue de 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y el LOQ de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. En la Tabla 47 se muestran los parámetros analíticos obtenidos para la determinación de ovoalbúmina mediante absorbancia.

Tabla 47. Parámetros analíticos obtenidos con los procedimientos espectroscópicos.

Método	Rango lineal ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recta de calibrado ($y = a + bx$)			LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
		$a \pm s_a$	$b \pm s_b$	R^2		
Absorbancia	100 – 500	$(14 \pm 2) \cdot 10^{-3}$	$(688 \pm 6) 10^{-6}$	0.9997	30	100
Fluorescencia	2.5 - 50	0.28 ± 0.06	0.040 ± 0.002	0.998	1	2.5

Finalmente se evaluó el posible efecto matriz fortificando algunas de las muestras de agua de lavado con ovoalbúmina a un nivel de concentración de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Las recuperaciones se calcularon a partir de la relación entre la señal analítica de la muestra fortificada y la señal obtenida para una disolución patrón de ovoalbúmina con la misma concentración. Las recuperaciones obtenidas se encuentran en el rango de 87 % a 110 %. Por tanto, se pudo concluir que la determinación de ovoalbúmina en muestras de agua de lavado no estaba afectada por la matriz.

Para la optimización del método de fluorescencia se llevó a cabo un estudio previo a fin de seleccionar la longitud de onda óptima tanto de excitación como de emisión. A pesar que la intensidad de fluorescencia es mayor cuando se excita a 220 nm, se obtuvo mayor sensibilidad empleando 280 nm como longitud de onda de excitación, puesto que a esta longitud de onda el espectro de emisión estaba afectado de menor ruido. Se seleccionaron como longitudes de onda óptimas de excitación y emisión 280 nm y 300 nm, respectivamente.

La influencia del pH en la fluorescencia también fue estudiada. Se observó que en medio básico (pH =13) la señal decrecía y el máximo de emisión se desplazaba a mayores longitudes de onda (384 nm). En la Figura 72, se muestran los espectros de emisión obtenidos para una disolución patrón de concentración $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ovoalbúmina a pHs 7 y 13. Estos resultados pueden explicarse atendiendo a los cambios que tienen lugar en la estructura química de la proteína. Por tanto, los resultados obtenidos indican que el pH influye significativamente en la determinación de ovoalbúmina por fluorescencia, siendo necesario ajustarlo previamente.

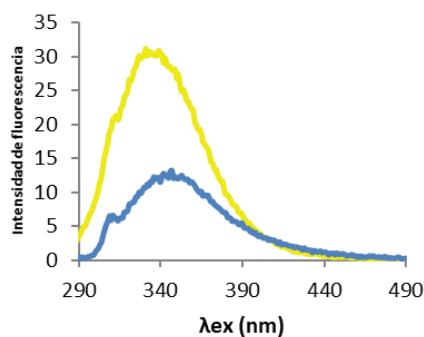


Figura 72. Espectro de emisión para una disolución de ovoalbúmina de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ a pHs 7 (amarillo) y 13 (azul).

Los parámetros analíticos obtenidos en la determinación fluorimétrica de ovoalbúmina a pH 13 se muestran en la Tabla 47. El LOD fue $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ y el LOQ fue $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Como se puede observar en la Tabla 47, la sensibilidad del método de absorción es peor que la obtenida para el método de fluorescencia; no obstante, ambos métodos son lo suficientemente sensibles para la determinación de ovoalbúmina en las muestras.

Para el seguimiento de la hidrólisis se aplicó el método cromatográfico previamente desarrollado, puesto que los procedimientos espectrofotométricos no son capaces de diferenciar entre la señal debida a la ovoalbúmina y la señal del triptófano y la tirosina libres. La concentración de ambos aminoácidos libres permitió calcular el porcentaje de ovoalbúmina hidrolizada.

En primer lugar se sometió a hidrólisis una disolución patrón de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ovoalbúmina y se procesó por el sistema IT-SPME-NanoLC-DAD, no observándose señal ni para el triptófano ni para la tirosina, lo que se atribuyó a la degradación térmica de los aminoácidos. Esto fue confirmado al comparar la señal analítica de una disolución mezcla de ambos aminoácidos antes y después de ser sometida al tratamiento térmico puesto que ésta era sensiblemente menor después del tratamiento. A partir de los resultados obtenidos se estableció que el triptófano se degradaba un 88 % y la tirosina un 76 %; estos resultados son similares a los publicados previamente por Simonato et al., 2008

Para calcular los porcentajes de hidrólisis se trató una muestra de agua de lavado y posteriormente se procesó por el sistema cromatográfico. En la Figura 73 se muestran los cromatogramas obtenidos para una disolución patrón de concentración $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de triptófano y $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ de tirosina, y el cromatograma correspondiente a una muestra de agua de lavado antes y después de la hidrólisis. Como se puede observar, en la muestra de agua sin hidrolizar no aparecieron los picos correspondientes al triptófano y la tirosina; sin embargo, estos picos sí se observaron cuando la muestra fue sometida al proceso de hidrólisis.

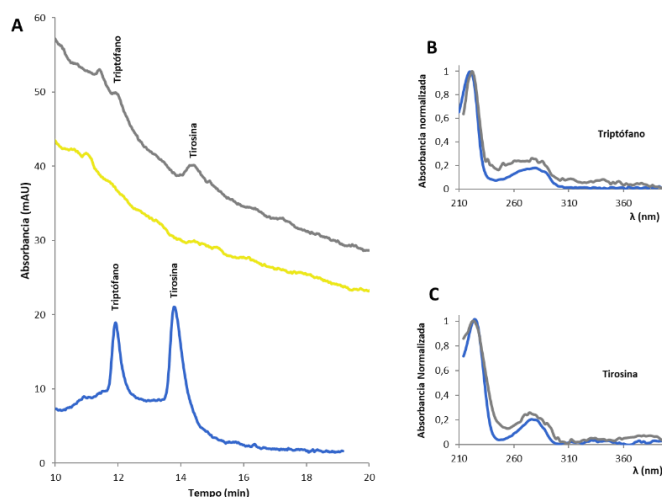


Figura 73. A) Cromatogramas obtenidos a 230 nm para la muestra hidrolizada (gris), muestras sin hidrolizar (amarillo) y disolución patrón de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de triptófano y $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ de tirosina (azul). Espectros UV normalizados de B) triptófano y C) tirosina.

Las señales obtenidas para el triptófano y la tirosina se interpolaron en las correspondientes rectas de calibrado (Tabla 46), calculando la concentración a partir de los porcentajes de degradación de cada aminoácido (88 % y 76 %). Finalmente, la concentración de ovoalbúmina en la muestra se calculó considerando la relación estequiométrica del número de moléculas de cada aminoácido en la molécula de ovoalbúmina. La concentración de ovoalbúmina determinada en la muestra de agua de la primera etapa del proceso de limpieza fue $(446 \pm 16) \mu\text{g mL}^{-1}$. Comparando este resultado con el obtenido utilizando las técnicas espectroscópicas (Tabla 48), se estimó que el porcentaje de hidrólisis del procedimiento utilizado es del 60 %. Este valor es comparable con el obtenido por Siminoato et al. (2008) y Sánchez-Machado et al. (2008).

Análisis de muestras

Se utilizaron las medidas de absorbancia y fluorescencia para determinar la concentración de ovoalbúmina en cuatro muestras de agua de lavado procedente de etapas consecutivas de un proceso de limpieza industrial. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 48. Como se puede observar la concentración de proteína es menor en las últimas etapas del proceso de limpieza.

Tabla 48. Resultados obtenidos con los procedimientos espectroscópicos.

Muestra	[Ovoalbúmina] ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
	Absorbancia	Fluorescencia
Etapas 1	399 ± 15	410 ± 20
Etapas 2	380 ± 20	381 ± 13
Etapas 3	313 ± 12	312 ± 11
Etapas 4	233 ± 3	250 ± 20

Se empleó un análisis de regresión para comparar las concentraciones obtenidas por ambos métodos espectroscópicos, obteniéndose la relación: Fluorescencia = $(15 \pm 20) + (0.97 \pm 0.07)$ Absorbancia ($R^2 = 0.990$). La pendiente es estadísticamente igual a 1 ($t_{\text{exp}, 95\%} = 0.85$; $t_{\text{tab}, 95\%} = 3.18$). A partir de estos resultados se pudo concluir que ambos métodos conducían a resultados estadísticamente equivalentes.

Comparación con otros procedimientos

En la Tabla 49 se comparan las características analíticas obtenidas por el método propuesto y por otros procedimientos descritos en la literatura para la determinación de triptófano y tirosina mediante LC. Como se puede observar en dicha tabla, los LODs obtenidos con el método propuesto son similares o inferiores a los obtenidos con otros procedimientos, a pesar de que estos utilizan detectores más sensibles. Solo dos de los procedimientos descritos en la Tabla 49 proporcionaban mayor sensibilidad que el procedimiento propuesto. El primero, descrito por Themelis, Gotti & Gatti (2017), utiliza un detector de fluorescencia y requiere la derivatización previa de los aminoácidos con Carbamato de 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil (AQC), siendo un método poco recomendable desde el punto de vista de la QAV, puesto que la etapa de derivatización incrementa el tiempo de análisis, el consumo de disolventes y los residuos generados. El segundo desarrollado por Qi y colaboradores (Qi et al., 2015) requiere de un detector de MS/MS para la identificación de triptófano y tirosina. La utilización de un detector MS/MS incrementa la sensibilidad del procedimiento, pero se trata de un detector caro y con un impacto ambiental considerable como ya se ha comentado en la Sección 4.1.1.1

Tabla 49. *Diferentes procedimientos descritos en la literatura para la determinación de triptófano y tirosina*

Separación		Detector	Derivatizante	LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Muestra	Hidrólisis/ tiempo (h)	Referencia
Técnica	Modo			Triptófano	Tirosina			
LC	RP	UV-vis	DABS-Cl	1	-	Octreotida	Calentamiento ácido/ 0.5	Akhlaghi et al., 2015
LC	HILIC	MS/MS	-	0.005	0.002	Tiroides	-	Qi et al., 2015
LC	RP	FD	-	0.1	-	Cereales y legumbres	Calentamiento básico, atmósfera de N_2 / 12	Çevikkalp et al., 2016
UHPLC	HILIC	MS	-	0.5	0.5	Mejillones	Calentamiento ácido en presencia de ácido tioglicólico/ 18	Li et al., 2017
LC	RP	FD	AQC	0.02	0.02	Te	-	Themelis et al., 2017
UHPLC	HILIC	MS	-	0.25	0.3	Plasma y orina de ratón	-	Wen et al., 2018
NanoLC	HILIC	DAD	-	0.1	0.3	Ovoalbúmina en aguas de lavado	Calentamiento básico/ 8	Método propuesto

Conclusiones

En esta sección se ha descrito por primera vez un procedimiento analítico que combina la IT-SPME en línea con NanoLC empleando HILIC para la separación cromatográfica. Este procedimiento se aplicó satisfactoriamente a la separación y determinación de triptófano y tirosina. Esta propuesta abre la puerta al desarrollo de nuevos procedimientos basados en IT-SPME-HILIC-NanoLC para la determinación de compuestos muy polares de una manera más rápida, sensible y sostenible.

Como fase de extracción se utilizó un capilar de sílice fundida recubierto de TEOS-MTEOS dopado con NPs de CuO. Esta fase se empleó satisfactoriamente para la extracción y preconcentración de compuestos polares como triazinas y sulfonilureas mediante IT-SPME-NanoLC en fase reversa (Sección 4.2.2.3). Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la fase TEOS-MTEOS con NPs de CuO también puede ser utilizada como fase de extracción cuando la separación cromatográfica tiene lugar en modo HILIC. Por tanto, se puede concluir que la fase TEOS-MTEOS dopada con NPs de CuO es un material versátil que puede ser utilizado como sorbente en IT-SPME acoplado a NanoLC tanto en fase reversa como en HILIC.

Los parámetros analíticos obtenidos fueron satisfactorios. Los LODs fueron $0.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ para el triptófano y $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ para la tirosina. Estos valores son satisfactorios teniendo en cuenta que la detección se realiza directamente mediante absorción UV-Vis sin utilizar ninguna derivatización. La RSD obtenida fue inferior al 10 %, indicando que se trata de un procedimiento preciso.

El método cromatográfico propuesto permite estudiar el rendimiento de la hidrólisis de proteínas, ya que se puede relacionar estequiométricamente la cantidad de aminoácidos liberados con la concentración inicial de proteína. Posteriormente, se ha demostrado la idoneidad del procedimiento propuesto para la determinación de triptófano y tirosina liberados durante la hidrólisis de la ovoalbúmina, con el fin de monitorizar la concentración de esta proteína en aguas residuales de la industria alimentaria en las diferentes etapas del proceso de limpieza, y evaluar así su eficacia.

4.2.2.7 Synthesis and characterization of VPBA-DVB boronate affinity monolith as extractive phase for IT-SPME-NanoLC

Preparation and characterization of the VPB-DB monolith capillary column

Typically, the extraction performance and life-time of monolith-based sorbents are affected by the content of monomer, cross-linker and porogenic solvent used to prepare the polymer. The polymerization time and temperature are parameters that can also influence the structure of the monolith. For these reasons, such parameters have been studied and optimized during the study aimed at preparing the new extractive columns. Table 50 shows the compositions of the polymerization mixtures tested for preparing the columns as well as their permeability. The permeability was measured for 15 cm length capillaries using water as mobile phase.

First, the ratio of VPB to DVB in the mixture of monomers was evaluated. As it can be seen in Table 50, the permeability was lower for columns with lower content of DVB which resulted in unsuitable columns for IT-SPME. SEM micrographs of the synthesized polymers showed that under conditions used for preparing column 2, a full capillary was obtained (Figure 74A). However, when conditions were those used for preparing column 1 a coating was obtained (Figure 74B).

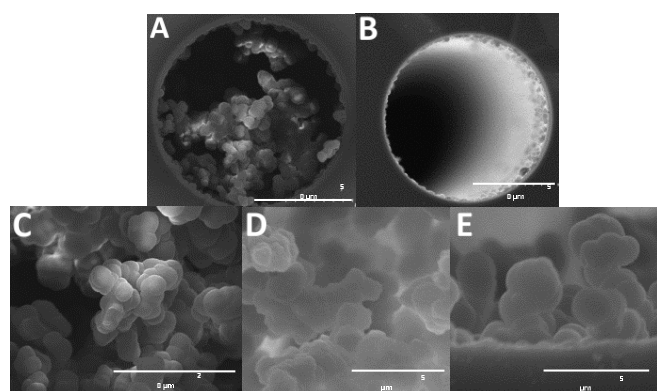


Figure 74. SEM micrographs of A, C) capillary 2; B) capillary 1; D) capillary 3; E) capillary 9.

Table 50. Conditions used for the synthesis of the new monolithic sorbent and permeability of the resulting columns.

column	Monomers Mixtures		Porogenic solvent				Polymerization mixture		T (°C)/ t (h)	Permeability (m ²)
	VPB (%)	DVB (%)	ACN (%)	MeOH (%)	DMSO (%)	Decanol (%)	Monomers Mixture	Porogenic solvent		
1	35	65	50	50	-	-	40	60	50 / 1	$7.197 \cdot 10^{-16}$
2	20	80	50	50	-	-	40	60	50 / 1	$3.856 \cdot 10^{-13}$
3	20	80	50	50	-	-	40	60	70 / 1	$4.752 \cdot 10^{-13}$
4	20	80	50	50	-	-	40	60	50 / 18	<<
5	20	80	50	50	-	-	40	60	70 / 18	$0.342 \cdot 10^{-13}$
6	20	80	50	50	-	-	40	60	50 / 6	<<
7	20	80	-	50	50	-	40	60	70 / 18	<<
8	20	80	-	100	-	-	40	60	70 / 18	<<
9	20	80	50	50	-	-	20	80	50 / 1	$5.334 \cdot 10^{-13}$

The temperature of con-condensation is a key factor in the formation of the pores and the skeleton of monoliths; thus, the reaction temperature was optimized for a ratio VPB/DVB of 20:80 (w/w) (Table 50). The results showed that when the polymerization temperature was increased from 50 °C to 70 °C (columns 2 and 3) and for a reaction time of 1 h, the permeability did not change significantly. However, as can be seen in Figure 75, the monolith synthesized at 70 °C (column 3) was not homogenous. In addition, as it can be seen in Figure 74D, the morphology of the monoliths of columns 2 and 3 were different. Column 2 exhibited a surface area higher than that of column 3. On the other hand, when the polymerization time was increased (columns 2, 4 and 6), we observed that the permeability decreased. Optic microscope images showed the formation of a compact polymer after 6 and 18 h of polymerization (Figure 75).

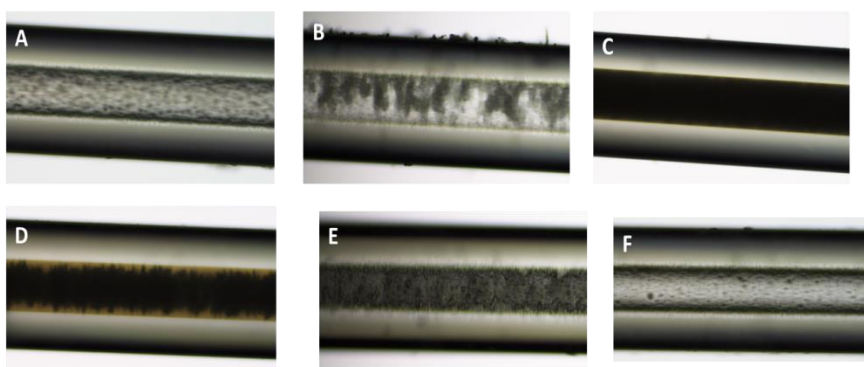


Figure 75. Images obtained by optic microscopy for A) column 2; B) column 3; C) column 4; D) columns 6; E) columns 7; F) column 9.

Next, the effect of the porogenic solvent was studied. The porogenic solvent plays an important role in dissolving both, monomers and initiators, in order to produce a homogeneous solution prior to the polymerization. They also determine the pore structure and permeability of the polymer. DMSO and dodecanal were tested but non permeable monoliths were obtained (Table 50, columns 7 and 8). However, a good permeability was achieved when using as a porogenic agent a mixture of acetonitrile and methanol (1:1, v/v).

Finally, the ratio between the monomer mixture and porogenic solution was tested. No differences were observed in the monolithic permeability at the studied ratios (Table 50, columns 2 and 9). Both monoliths were homogeneous, (Fig 75) and the SEM micrographies showed that the morphology in both cases was similar (Figure 74 D and E). It was concluded that the capillary columns 2 and 9 were the best options to be used for IT-SPME.

Extraction performance

Next, we studied the extraction capability of the selected phases (columns 2 and 9) for some pesticides: iodosulfuron-methyl, tritosulfuron, metribuzin, tribenuron-methyl, desethyl-terbuthylazine, terbuthylazine, irgarol®-1051, fenthion, fenitrothion and bifenox. This study was carried out by processing 500 μL of aqueous solution of the pesticides in each of the selected columns. Figure 76 shows the analytical signals obtained with the VPBA-co-DVB monolith and with coated capillaries TEOS-MTEOS-TiO₂. As it can be seen, the VPBA-co-DVB phase provided better results than the TEOS-MTEOS-TiO₂ phase for the most polar analytes.

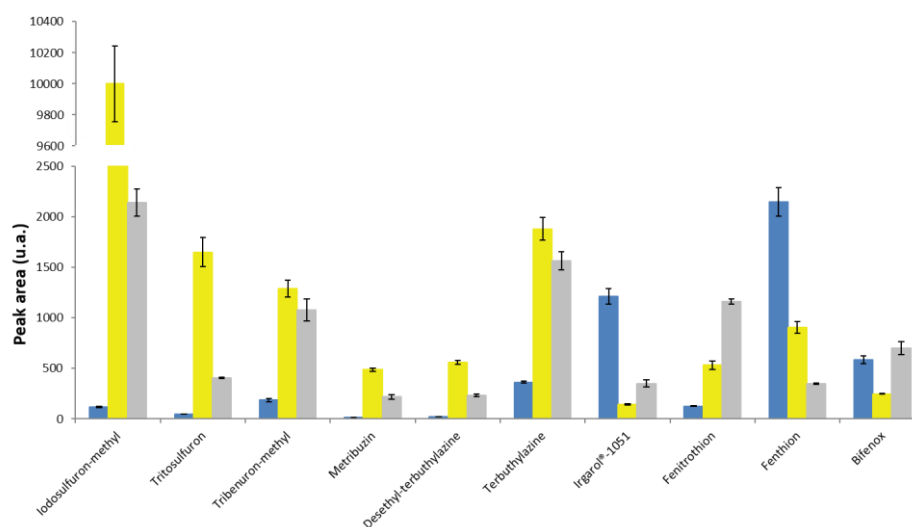


Figure 76. Peak area obtained using TEOS-MTEOS-TiO₂ (blue), column 2 (yellow) and, column 9 (gray) as extractive phase for 500 μL of stock solutions of iodosulfuron-methyl (20 $\mu\text{g L}^{-1}$), tribenuron-methyl, fenthion, fenitrothion and bifenox (10 $\mu\text{g L}^{-1}$), tritosulfuron (5 $\mu\text{g L}^{-1}$), desethyl-terbuthylazine (1 $\mu\text{g L}^{-1}$) and metribuzine, terbuthylazine and irgarol®-1051 (2.5 $\mu\text{g L}^{-1}$).

A VPBA-co-DVB extraction phase could interact with the analytes by hydrophobic interaction (π - π), hydrogen bonding or Lewis acid-base interactions. In this case, all the tested analytes have a similar structure, and then, hydrophobic interactions are not expected to introduce significant differences (Espina-Benítez et al., 2017). The acid Lewis character of the boronic ligand allows strong integration with analytes with donor atoms such as N, I or F. This affinity could be responsible of the high extraction rate of tritosulfuron and iodosulfuron-methyl-sodium in relation with the same structure without donor atoms as in the molecule of tribenuron-methyl (Figure 76). This kind of interaction can also explain the strong retention of iodosulfuron-methyl because of its negative charge. Fenthion and fenitrothion have donor groups (nitro, thioether and P=S) that can interact with boronic atom, thus enhancing the extraction rate.

On the other hand, hydrogen bonding interactions between the analytes and boronic phase contribute to increase the adsorption capacity (Zhang, Cheng, Li and Xiao, 2015). As can be seen in Figure 76, when using the VPBA-co-DVB phase signals were about 24 and 5.2 times higher than those achieved with TEOS-MTEOS-TiO₂ phase for desethyl-terbuthylazine and terbuthylazine, respectively. These results indicate that the presence of NH₂ groups increases the extraction capacity.

Irgarol®-1051 and fenthion were the only analytes for which the TEOS-MTEOS-TiO₂ extraction phase provided a higher signal. Probably, this is due to the fact that the main interactions between the analytes and extractive phase are hydrophobic, as they are rather apolar (log Kow = 3.10, and, 4.0, respectively). In spite of the low polarity of fenitrothion and bifenox the signals observed for these compounds were higher with VPBA-co-DVB phase because they have a nitro functional group that can interact with boronic groups through acid-base Lewis interaction.

As can be seen in Table 50, differences on the permeability and on the structure (Fig 74) between column 2 and column 9 were not observed, but the analytical signals obtained were substantially different (Fig. 76). These results could be explained by the arrangement of the monomers in the polymeric matrix. The DVB to VPBA monomers ratio was probably lower in column 2 than in column 9. Then, the active sites for specific interactions of boronic ligand are lower in column 9, enhancing π - π interactions. Thus, column 9 provided higher signal for apolar compounds than column 2.

Pure water was assayed in order to check background peaks with the two columns tested. Figure 77 shows the chromatograms obtained when processing of 500 μL nanopure water using columns 2 and 9 as extractive phases (both 15 cm length). The figure shows that the background observed with column 9 was lower than that achieved with column 2. With the latter column only three minor peaks were observed probably due to compounds present at trace level in the nanopure water. In contrast, several intense peaks were found with column 2. Although the analytical signals using capillary column 2 were higher than those obtained with column 9, the sensibility reached with column 9 was enough for environmental analysis. Therefore, column 9 was selected as extractive phase for IT-SPME.

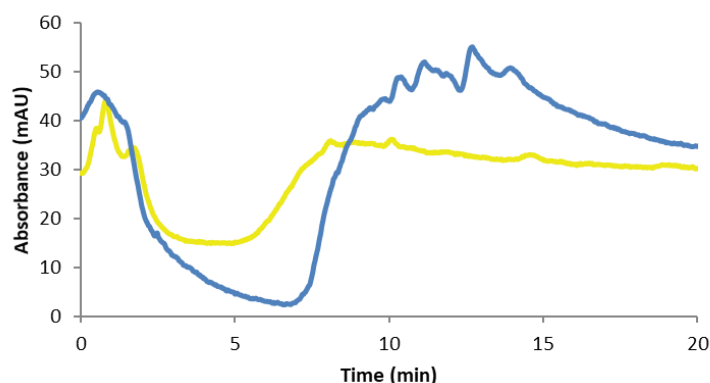


Figure 77. Chromatograms obtained at 230 nm when processing 500 μL of water using column 2 (blue) and column 9 (yellow) for IT-SPME.

IT-SPME optimization

In the next stage we established the optimal parameters for the IT-SPME, as the extraction efficiency was affected by working conditions such as the volume of sample processed and length of the column.

Firstly, the effect of the length of the column was studied. For this purpose 500 μL of a solution of the target compounds were processed in capillary columns of 10, 12 and 15 cm length. Columns with less 10 cm of length were not tested because they could not be connected to the valve ports, whereas poor peak profiles were obtained when capillary columns longer than 15 cm were used. No differences in the responses were obtained with the three columns.

Next, the effect of the sample volume was evaluated. In this study, increasing volumes of stock solutions of the target compounds were processed using a column of 10 cm length. The analytical responses obtained for the processed volumes are shown in Figure 78A. As it can be seen, the peak areas increased with the sample volume within the tested range.

Figure 78B shows the chromatograms obtained at 230 nm when 0.5 and 2 mL of stock solution of $5 \mu\text{g L}^{-1}$ of tribenuron-methyl, fenthion and fenamiphos and $1 \mu\text{g L}^{-1}$ of TBA were processed. As it can be seen, the analytical signal increased when 2 mL of sample were assayed, but the chromatographic resolution decreased because the impurities were also preconcentrated. Consequently, 500 μL were selected as optimum sample volume.

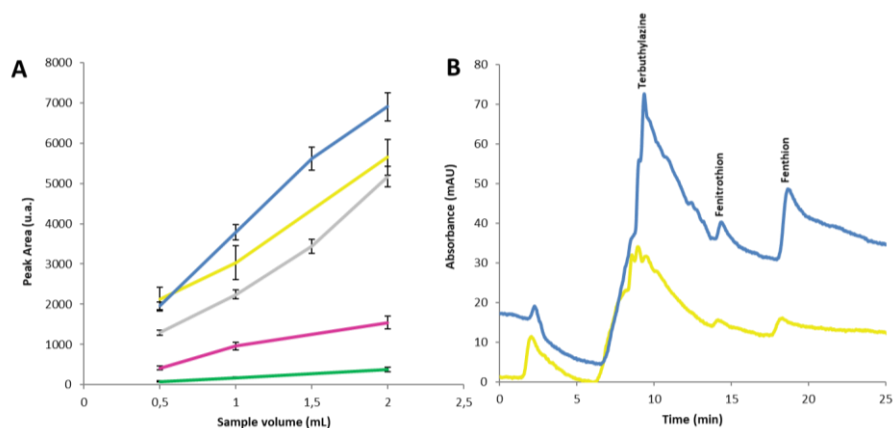


Figure 78. A) Variation of peaks areas with the sample volume for solutions of $10 \mu\text{g L}^{-1}$ of metribuzin (blue) and irgarol®-1051 (gray), $50 \mu\text{g L}^{-1}$ of iodosulfuron-methyl (yellow) and tritosulfuron (purple) and $1 \mu\text{g L}^{-1}$ of desethyl-terbuthylazine (green); B) Chromatograms obtained at 230 nm when processing 500 μL (blue) and 2 mL (yellow) of stock solution of $1 \mu\text{g L}^{-1}$ of terbuthylazine and $5 \mu\text{g L}^{-1}$ of fenitrothion and fenthion.

Analytical parameters

The column-to-column precision was evaluated by calculating the RSD for extraction of the target compounds. The precision achieved was suitable for intra-synthesis (<10 %) and inter-synthesis (<15 %). These results proved that the synthesis of the VPBA-co-DVB polymer was reliable and reproducible. Moreover, the prepared monolith showed a good stability. The LODs and LOQs obtained for the compounds assayed are listed in Table 51.

Table 51. LODs obtained by using as extractive phase VPBA-DVB and TEOS-MTEOS doped with TiO₂ and SiO₂ NPs polymers.

Compound	LOD (µg L ⁻¹)		
	VPBA-DVB	TEOS-MTEOS-TiO ₂	TEOS-MTEOS-CuO
Iodosulfuron-methyl	0.1	2	2.5
Tritosulfuron	0.25	1	1
Tribenuron-methyl	0.2	0.5	0.5
Metribuzin	0.2	0.75	0.5
Desethyl-terbuthylazine	0.1	0.5	0.2
Terbuthylazine	0.02	0.04	0.05
Irgarol®-1051	0.15	0.03	0.1
Fenitrothion	0.2	0.5	-
Fenthion	0.6	0.1	-
Bifenox	0.3	0.3	-

As can be seen from Table 51, the LODs obtained with VPBA-DVB phase were lower than those achieved with the TEOS-MTEOS phase doped with TiO₂ and CuO NPs. The improvement is more intense for the most polar compounds. For example, the LOD for iodosulfuron-methyl is 20 times lower with VPBA-DVB phase than with the TEOS-MTEOS-TiO₂ because this phase could interact more strongly with the analyte through hydrophilic interactions. However, the TEOS-MTEOS-TiO₂ provides higher extraction capacity for the less polar compounds such as irgarol®-1051 and fenthion. Therefore, the VPBA-DVB phase is the best option for IT-SPME of highly polar compounds.

Conclusions

Poly(4-vinylphenylboronic acid-co-divinylbenzene) monolith capillary columns were synthesized successfully inside a silica capillary with 75 μm of d.i. These columns have been used for IT-SPME coupled to NanoLC for the analysis the pesticides iodosulfuron-methyl-sodium, tritosulfuron, tribenuron-methyl, metribuzin, desethyl-terbuthylazine, terbuthylazine, irgarol[®]-1051, fenitrothion, fenthion and bifenox.

The extraction efficiencies obtained by using the new monolithic column were higher than those achieved with TEOS-MTEOS-TiO₂ phase for the most polar analytes. It has been estimated that the proposed phase provides analytical signals between 4 and 18 times higher than those attained with the TEOS-MTEOS-TiO₂ phase for such compounds. The main interactions involved were π - π , hydrogen bounding and Lewis acid-base interaction. Satisfactory sensitivity was achieved, especially for highly polar compounds.

4.3 SPME FUERA DE LÍNEA

En este apartado se muestran los resultados obtenidos en dos procedimientos que emplean IT-SPME y MEPS fuera de línea. Ambos procedimientos se han desarrollado para la determinación de QACs en muestras de agua residuales procedentes de la industria alimentaria.

En primer lugar se desarrolló un procedimiento basado en la influencia de los QACs en la absorbancia del complejo coloreado CAS-Al(III). Con dicho procedimiento se pudo cuantificar la cantidad de QACs presentes directamente en la disolución o empleando un hisopo de algodón para muestrear tanto en muestras acuosas como en superficies. Con el fin de incrementar la sensibilidad del procedimiento desarrollado se propone la utilización de IT-SPME fuera de línea para preconcentrar los compuestos de interés.

Por otro lado, se ha desarrollado un dispositivo basado en MEPS que utiliza como material sorbente cenizas de café, posibilitando la determinación de BAC en muestras de agua residual sin necesidad de derivatizar. La utilización de materiales residuales para otros fines es una opción muy interesante desde el punto de vista de la sostenibilidad, puesto que convierten residuos en materiales útiles. No obstante, la utilización de residuos como sorbentes requiere de una exhaustiva caracterización. Con esa perspectiva se ha simplificado el método de referencia para la determinación de hierro en cenizas de alimentos (ISO 5517:1978).

4.3.1. IT-SPME para la determinación de QACs

A continuación, se describe el estudio realizado para el desarrollo de un procedimiento in-situ que permite la rápida determinación de restos de QACs en superficies y en aguas residuales de la industria alimentaria. Como continuación del estudio anterior se empleó IT-SPME fuera de línea como técnica de preconcentración de QACs en muestras de agua residual a fin de mejorar la sensibilidad.

Interacción entre los QACs y la celulosa

La celulosa es un biopolímero formado exclusivamente por moléculas de glucosa unidas entre sí por un enlace β -1,4-O-glucosídico (Figura 79A). Los grupos hidroxilo de las moléculas de glucosa están disponibles para interactuar entre sí dando lugar a estructuras con un alto grado de polimerización como el algodón. Las fibras naturales de celulosa están cargadas negativamente debido a la presencia de grupos carboxilo e hidroxilo. En medio acuoso, estos grupos interactúan con especies aceptoras de electrones a través de interacciones electroestáticas y de tipo puente de hidrógeno (Janhot et al., 2004; Kaewspravit et al., 1998). Los compuestos cargados positivamente como los QACs son especies aceptoras de electrones (Figura 79B).

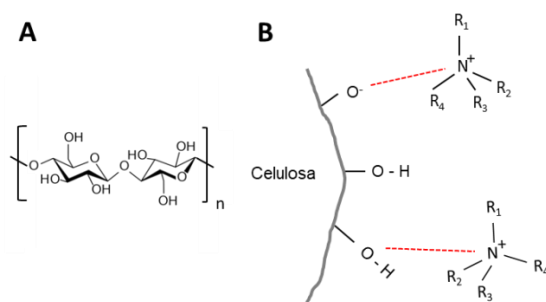


Figura 79. A) Estructura de la celulosa; B) representación de las interacciones entre la celulosa y los QACs ($R_1R_2R_3R_4N^+$)

Teniendo en cuenta la interacción entre la celulosa y los compuestos cargados positivamente, se estudió la posibilidad de utilizar dos soportes de celulosa, tiras de papel e hisopos de algodón, como medio para la toma de muestra, derivatización y medida en la determinación de QACs.

Para ello se partió del procedimiento descrito por Afkhami et al. (2011), el cual se basa en la influencia de los QACs sobre la absorbancia del complejo CAS-Al(III). En primer lugar se estudió la reacción en disolución. Para ello, se prepararon disoluciones del reactivo derivatizante (CAS-Al) en tampón acetato 0.01 M de pH 5.4, tomando las concentraciones propuestas por Afkhami et al. (2011), 10^{-4} de CAS y 1 mg L^{-1} de la disolución de Al(III) preparada a partir de $\text{KAl}(\text{SO}_4) \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. Seguidamente, se midió el espectro de absorción de las disoluciones patrón del QAC DDAC en el intervalo de concentraciones que va de 3.62 a $36,2 \text{ mg L}^{-1}$. Bajo las condiciones de trabajo, la disolución con el reactivo CAS-Al es de color rojo con un máximo de absorción a 586 nm. En presencia de DDAC se produce un desplazamiento del máximo de absorción del complejo, con un punto isobéptico a 598 nm (Figura 80A).

Los ensayos con los soportes de papel y algodón fueron llevados a cabo sumergiéndolos sucesivamente durante un tiempo determinado en la disolución patrón de DDAC, en la disolución de reactivo derivatizantes CAS-Al, y finalmente en agua (Sección 3.5.4). En ambos soportes se observó el color azul correspondiente a la formación del complejo ternario, pero a bajas concentraciones de DDAC no se apreciaba claramente la formación del complejo azulado, pues predominaba el rojo del reactivo CAS-Al. No obstante, si se sumergía el soporte con el derivado formado en agua, el exceso de reactivo pasaba a la disolución mientras que el complejo azul permanecía en el soporte. Esta observación confirmó la alta afinidad del DDAC por la celulosa. Cabe mencionar que, en el caso de los hisopos de algodón, solo se observó el color azul solo sobre la superficie externa del algodón.

Por otra parte, no se observó variación en la intensidad de la absorbancia cuando se procesaron disoluciones con una concentración de DDAC mayor a $36,2 \text{ mg L}^{-1}$. Esto sugiere que el número de sitios activos de la superficie del algodón es limitado. A similar conclusión llegó Kaewprasit et al., (1998) al estudiar las isotermas de absorción del azul de metileno en las fibras de algodón.

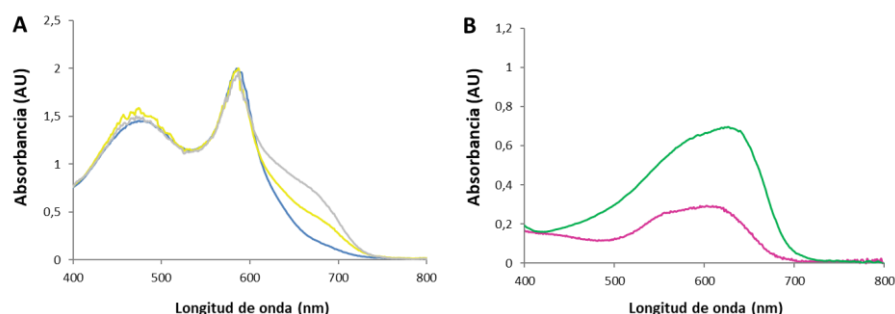


Figura 80. Espectros de absorción obtenidos para A) una disolución de CAS-Al (azul) y CAS-Al en presencia de 3.62 mg L^{-1} (amarillo) y 9.05 mg L^{-1} (gris) de DDAC; B) disolución patrón de DDAC de concentración 36.2 mg L^{-1} procesada por el método de papel (morado) e hisopo de algodón (verde).

Selección del soporte

Se estudió a continuación qué soporte ofrecía mejores resultados, papel o algodón. Para ello, se midió la absorbancia por reflectancia difusa de ambos soportes tras sumergirlos en disoluciones patrón de DDAC según el protocolo descrito en el la Sección 3.5.4.

Con ambos soportes se observó la formación del complejo azulado hasta una concentración de 3.62 mg L^{-1} DDAC, con un máximo de absorción a 626 nm . Como se puede observar en la Figura 80B, la intensidad de la señal fue mayor cuando se utilizó algodón.

Se observó una respuesta lineal en el intervalo de concentraciones de DDAC de 3.62 a 36.2 mg L^{-1} para ambos soportes. Las rectas de calibrado obtenidas fueron: $A = -0.009 + 0.00424 C$ ($R^2 = 0.996$) y $A = 0.19 + 0.0157 C$ ($R^2 = 0.996$) utilizando como soporte papel y algodón, respectivamente ($n = 6$), donde A es la absorbancia y C la concentración de DDAC en mg L^{-1} . A partir de los resultados obtenidos se seleccionó el algodón como medio de muestreo, reacción y medida.

Selección de las condiciones de trabajo

Seguidamente se optimizaron las condiciones de derivatización y muestreo, utilizando una disolución patrón de DDAC de 18.1 mg L^{-1} . En primer lugar, se estudió cómo influía el tiempo de muestreo en la absorbancia a 598 nm , empleando un tiempo de reacción y de lavado de 2 min . Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 81A. Como se puede observar, después de 5 min de muestreo se obtuvo la máxima señal la cual no variaba significativamente para tiempos mayores; se tomó como tiempo óptimo de muestreo 5 min . A continuación, se optimizó el tiempo de reacción, obteniéndose 5 min como valor óptimo (Figura 81B). Adicionalmente se estudió el efecto de aumentar la cantidad de agente derivatizante o el tiempo de lavado, pero no se obtuvo una mejora significativa de la señal.

Por otro lado, se estudió la influencia del volumen de muestra en el rango de 0.5 a 25 mL , obteniéndose respuestas similares para todos los volúmenes. Cabe destacar que los resultados obtenidos cuando se trabajó con 0.5 mL de muestra fueron peores en términos de precisión, dado que la distribución del complejo azul por la superficie del algodón no era homogénea. Se concluyó que el volumen de muestra no era un parámetro crítico. Ello supone una clara ventaja, ya que el método propuesto podría utilizarse fácilmente en el análisis de campo sin necesidad de medir el volumen de muestra.

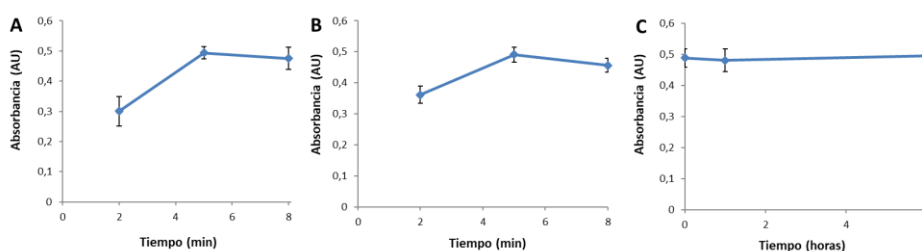


Figura 81. Influencia en la absorbancia de los parámetros: A) tiempo de muestreo; B) tiempo de reacción; C) estabilidad en el tiempo medidas para una disolución patrón de DDAC de concentración 18.1 mg L^{-1} .

Finalmente se estudió la estabilidad del complejo formado, es decir, el tiempo que puede pasar desde que se forma el complejo hasta que se realiza la medida. Para ello se muestreó con varios hisopos una disolución de DDAC de concentración 18.1 mg L^{-1} , y se midió la absorbancia en un periodo de 6 horas desde la etapa de lavado. Durante este estudio, los hisopos estuvieron expuestos a condiciones ambientales, por tanto se asumió una disminución del porcentaje de humedad del algodón a lo largo del estudio. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 81C. Se observó que la absorbancia no variaba significativamente a lo largo del tiempo, es decir, el porcentaje de humedad no afecta a la absorbancia y el complejo formado era estable al menos 6 horas después de la derivatización.

Para calcular la cantidad de DDAC extraído con las condiciones de trabajo propuestas se compararon la señal analítica obtenida para diferentes disoluciones patrón de DDAC en el intervalo de 3.62 mg L^{-1} y 136.2 mg L^{-1} , y la señal obtenida para estas mismas disoluciones después de extraer el analito con un hisopo de algodón. El porcentaje de DDAC extraído se calculó como la relación entre las pendientes de las rectas de calibrado obtenidas para la muestra directamente derivatizada y la muestra derivatizada después de introducir los hisopos de algodón. Los valores obtenidos fueron 0.0499 L mg^{-1} y 0.0115 L mg^{-1} , respectivamente. Por tanto, el porcentaje de extracción para el DDAC resultó ser del 77 %.

De acuerdo con los resultados obtenidos, las condiciones óptimas para el análisis con los hisopos de algodón fueron las siguientes. En primer lugar se sumerge el hisopo en 1 mL de muestra durante 5 min, y a continuación, en 1 mL de la disolución derivatizante durante otros 5 min. Finalmente se elimina el exceso de reactivo sumergiendo el hisopo durante 2 min en 1 mL de agua nanopura. Este procedimiento se siguió para la determinación de los QACs DDAC, BAC y DOAC. Los espectros obtenidos para estos tres compuestos en la superficie del algodón se muestran en la Figura 82A.

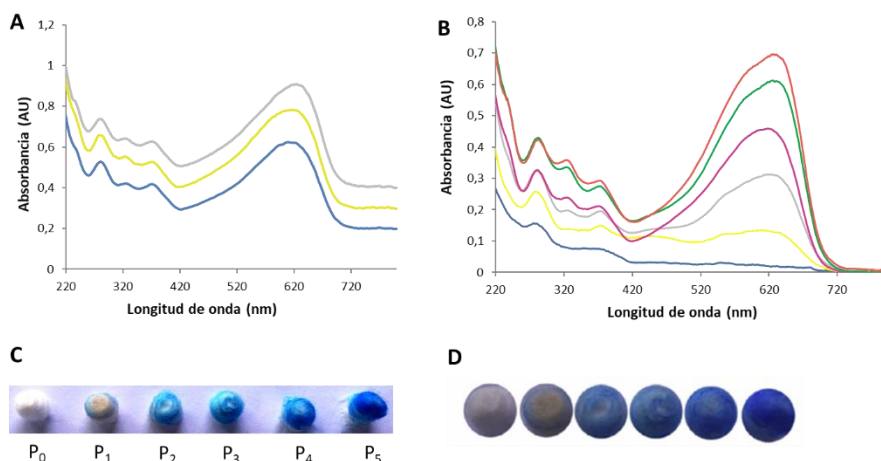


Figura 82. Espectros de absorción UV para: A) una disolución de 18.4 mg L^{-1} de BAC (gris), 18.1 mg L^{-1} de DDAC (amarillo) y 15.3 mg L^{-1} de DOAC (azul); B) diferentes disoluciones patrón de DDAC; C) imágenes de los hisopos medidos en B; D) representación de la carta de colores. Concentraciones: P_0 blanco, P_1 3.62 mg L^{-1} , P_2 9.05 mg L^{-1} , P_3 18.1 mg L^{-1} , P_4 27.2 mg L^{-1} y P_5 36.2 mg L^{-1} .

Parámetros analíticos

Se estudió la linealidad, la precisión, la exactitud y la incertidumbre a dos niveles de concentración, así como la sensibilidad y selectividad en presencia de potenciales interferentes. También se estudió la respuesta obtenida para mezclas de diferentes QACs.

Los intervalos de concentración para los que la señal depende linealmente de la concentración, los parámetros de las rectas de calibrado y los LODs y LOQs se muestran en la Tabla 52. Como se puede observar, se obtuvo una linealidad satisfactoria en el intervalo de trabajo. Como ejemplo ilustrativo, en la Figura 82B se han representado los espectros de absorción obtenidos para diferentes disoluciones patrón de DDAC, y en la Figura 82C se muestra una fotografía de los correspondientes hisopos. Cabe mencionar que el método propuesto permite la estimación visual de forma semicuantitativa de la concentración de QACs por comparación del hisopo con una escala de colores como la que se muestra en la Figura 82D.

Tabla 52. Parámetros analíticos obtenidos para los QACs ensayados.

Analito	Intervalo lineal (mg L ⁻¹)	Recta de calibrado ($y = a + bx$) ¹		Precisión ² RSD (%)				LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)	
				Intradía (n = 5)		Interdía (n = 5)				
		a ± s _a	b ± s _b	R ²	Baja conc.	Alta conc.	Baja conc.	Alta conc.		
DDAC	3.62 - 36.2	36 ± 6	22.4 ± 0.6	0.997	9	12	8	17	0.8	3
BAC	3.68 - 36.8	201 ± 8	19.9 ± 0.8	0.994	11	10	14	17	1.2	4
DOAC	3.06 - 30.6	31 ± 9	25.0 ± 1.0	0.994	8	11	10	15	1.1	4

¹concentración expresada en mg L⁻¹. ² Baja conc. 9.0, 9.2 y 7.7 mg L⁻¹; alta conc. 27.1, 27.6 y 22.95 mg L⁻¹ para DDAC, BAC y DOAC, respectivamente.

Para facilitar la comparación de las respuestas obtenidas para los tres compuestos estudiados se recalcularon las rectas de calibrado expresando la concentración en molaridad. La molaridad del BAC se calculó teniendo en cuenta la abundancia de los diferentes compuestos homólogos en la disolución patrón. Las pendientes de las rectas de calibrado fueron (8100 ± 200) , (7300 ± 300) y (7800 ± 400) L mol⁻¹ para DDAC, BAC y DOAC, respectivamente. Estos resultados muestran que no solo los espectros de absorción de los tres compuestos son similares (Figura 82A) sino que también las pendientes de las rectas de calibrado expresadas en molaridad son equivalentes. Esto coincide con los resultados publicados previamente (Afkhami et al., 2011; Ensafi, Hemmateenejad & Barzegar, 2009). Por tanto, el método propuesto puede ser considerado como un método para estimar la concentración total de QACs.

Con el fin de estudiar las posibles variaciones en la respuesta analítica según la proporción de cada QACs en una mezcla de éstos, se prepararon disoluciones con diferentes mezclas de los analitos (Tabla 53) y se compararon las absorbancias obtenidas para cada disolución mezcla con la suma de señal obtenida para disoluciones patrón de cada analito por separado a la misma concentración. Como se puede observar en la Tabla 53, los resultados obtenidos mostraron que las diferencias entre la señal de las mezclas y la suma de las señales por separado fueron del mismo orden que las obtenidas entre réplicas de la misma disolución ($n = 6$).

Tabla 53. Diferencias entre la absorbancia medidas para una disolución mezcla de QACs y la medida para disoluciones individuales ($n = 6$).

Composición de la mezcla	Relación de señales ¹
3.62 mg L ⁻¹ de DDAC + 17.72 mg L ⁻¹ de BAC	-6
14.5 mg L ⁻¹ de DDAC + 3.68 mg L ⁻¹ de BAC	+14
7.24 mg L ⁻¹ de DDAC + 7.36 mg L ⁻¹ de BAC	-15
9.1 mg L ⁻¹ de DDAC + 15.3 mg L ⁻¹ de DOAC	+11

¹) $\frac{\text{Absorbancia de la mezcla} - \text{Suma de absorbancias de la disolución individual}}{\text{Suma de absorbancias de la disolución individual}} \cdot 100$

La precisión fue estudiada a dos niveles de concentración, obteniéndose valores de RSD ≤ 12 % y ≤ 19 % para la precisión intradía e interdía, respectivamente, valores que pueden considerarse satisfactorios para este tipo de análisis.

Respecto a la exactitud del método, ésta se evaluó comparando los resultados con los obtenidos al aplicar el procedimiento en disolución propuesto por Afkhami et al. (2011). Se analizaron por ambos métodos dos disoluciones patrón conteniendo 9.1 y 27.2 mg L⁻¹ de DDAC, observándose que los resultados proporcionados por ambos métodos eran significativamente comparables ($t_{\text{calculada}} = 0.62$ y 0.54 ; $t_{\text{tabulada}} = 2.77$, para un nivel de confianza del 95 %).

La incertidumbre conjunta (U) de los resultados obtenidos con el método propuesto fue calculada considerando la guía EURACHEM/CITAC (Ellison et al., 1995). Se consideró la incertidumbre asociada a la preparación de patrones (U_1), a la recta de calibrado (U_2), a la precisión (U_3) y a la exactitud (U_4) (Konieczka & Namiesnik, 2010; Ratola et al., 2006). En la Tabla 54 se muestran los valores de incertidumbre expandida ($k = 2$) obtenidos para dos niveles de concentración. En la misma tabla se muestran las concentraciones obtenidas al aplicar el método propuesto expresadas como media de la concentración \pm incertidumbre expandida.

Tabla 54. Incertidumbres parciales asociadas a los resultados (expresado como desviación estándar relativa) para dos concentraciones de DDAC e incertidumbre combinada y expandida ($k=2$); concentraciones $\pm U$ ($k=2$) calculadas con el método propuesto.

	Nivel de concentración (mg L ⁻¹)	
	9.1	27.2
Incertidumbre asociada a la preparación de patrones (U_1)	0.00232	0.00232
Incertidumbre asociada a la recta de calibrado (U_2)	0.0973	0.03381
Incertidumbre asociada a la precisión (U_3)	0.0682	0.0860
Incertidumbre asociada a la exactitud (U_4)	0.0311	0.0311
Incertidumbre combinada $U = (U_1^2 + U_2^2 + U_3^2 + U_4^2)^{1/2}$	0.1228	0.0991
Incertidumbre expandida ($k = 2$) (valor absoluto)	2.23	5.39
Concentración calculada (mg L ⁻¹)	9 ± 2	28 ± 5

Finalmente se evaluó la selectividad del procedimiento propuesto en presencia de sustancias que se pueden encontrar en residuos de la industria alimentaria. Un ejemplo serían los surfactantes aniónicos. En este estudio se seleccionó el SDS como modelo de surfactante aniónico. En la Figura 83 se muestra una fotografía de los hisopos después de analizar una disolución de concentración 18.1 mg L^{-1} de DDAC (Figura 83A) y otra disolución que contenía 28.8 mg L^{-1} de SDS (Figura 83B). Si se comparan ambas imágenes se observa que el SDS no da lugar al color azul, y por tanto no interfiere. Por otro lado, se estudió si el NaCl y la sacarosa, dos de los principales residuos en la industria alimentaria (Zeng, et al. 2014a y b) interfieren en la determinación. Para ello se procesaron una disolución de DDAC de concentración 18.1 mg L^{-1} que contenía NaCl al 10 % (m/v) y otra con sacarosa al 10 % (m/v). No se observaron diferencias en la respuesta analítica respecto a la disolución patrón de DDAC.

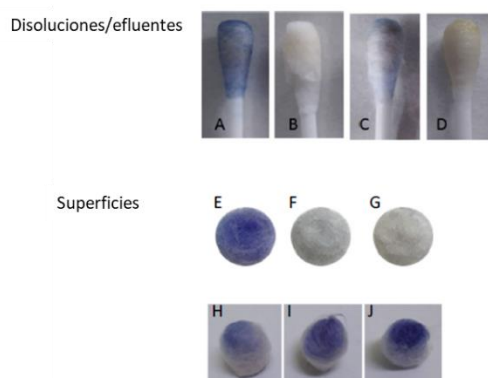


Figura 83. Imágenes de los hisopos obtenidos al muestrear: disoluciones individuales de A) 18.1 mg L^{-1} de DDAC, B) 21.6 mg L^{-1} de SDS, C) efluente positivo en QACs, D) efluente negativo en QAC; superficies de 1 cm^2 de E) vidrio con $3.5 \text{ } \mu\text{g}$ de DDAC y F) la misma superficie después de E; G) vidrio sin QACs (blanco) y superficie de vidrio fortificada con $3.6 \text{ } \mu\text{g cm}^{-2}$ de DDAC de área: H) 1 cm^2 , I) 2 cm^2 , J) 4 cm^2 .

Para estudiar la influencia del pH se analizaron con el método propuesto dos disoluciones de DDAC que contenían HNO_3 al 0.1 % (m/v) y NaOH al 0.1 % (m/v) (Moliner-Martínez et al., 2014). No se observaron diferencias significativas en la señal para la muestra ácida. Sin embargo, para la muestra de pH básico la señal obtenida era significativamente más baja. Estos resultados se pueden explicar por la competición entre el anión CAS y los grupos hidroxilo por interaccionar con el aluminio catiónico (Afkhami et al., 2011). Por tanto, antes de aplicar el procedimiento sería necesario neutralizar con ácido las muestras, si estas presentan una elevada alcalinidad.

Aplicación a muestras de aguas de lavado

El método propuesto se aplicó a la determinación QACs totales en muestras de agua residual obtenidas en diferentes etapas del proceso de lavado de una industria alimentaria. El pH de las muestras se situaba en el rango de 4.0 a 6.0, por lo que no fue necesario un ajuste previo del pH. En la Figura 83C se muestra el hisopo obtenido al analizar una muestra con un contenido de QACs próximo al LOQ, tomando como referencia el DDAC. En la Figura 83D, se observa el hisopo de resultante al analizar una muestra con una concentración de QACs inferior al LOD.

IT-SPME fuera de línea

Con el fin de incrementar la sensibilidad del procedimiento evaluó la posibilidad de aplicar IT-SPME fuera de línea. Como fase de extracción se utilizó un segmento de 370 cm de una columna de CG comercial TRB-35. Al tratarse de un sistema fuera de línea, se puede utilizar una columna de extracción de mayor longitud con el fin de conseguir mayores factores de preconcentración, puesto que en este caso no existen las limitaciones asociadas al aumento de presión y el ensanchamiento de picos del acoplamiento a LC.

En primer lugar se optimizó el volumen de muestra procesada. Cabe destacar que el procedimiento se desarrolló para muestras de agua residual, por lo que se consideró que el volumen de muestra disponible no estaba limitado. Se observó que la señal analítica se incrementaba a medida que aumentaba el volumen de muestra procesado hasta los 10 mL. Para volúmenes superiores no se obtuvo un incremento significativo de la señal. Se tomó 10 mL como volumen de muestra óptimo.

En la Figura 84 se muestra el espectro de absorción obtenido al procesar 10 mL de una disolución patrón conteniendo $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de BAC y otra con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de DDAC. Como se puede observar, la señal analítica es considerablemente mayor cuando se procesa la muestra por el sistema IT-SPME. Se estimó que la señal analítica se incrementaba aproximadamente 5.2 veces para el BAC y 4.8 veces para el DDAC. Los LODs obtenidos fueron 0.2 y 0.1 mg L^{-1} para el BAC y el DDAC, respectivamente.

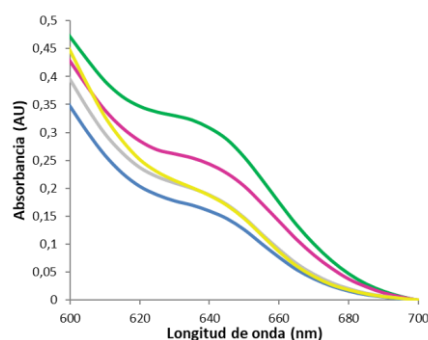


Figura 84. Espectro de absorción UV de una disolución patrón de BAC de 2.5 mg L^{-1} (amarillo) y 5 mg L^{-1} (gris) y las disoluciones procesadas por IT-SPME de agua nanopura (azul), BAC 2.5 mg L^{-1} (morado) y DDAC 5 mg L^{-1} (verde).

Ambos compuestos poseen una estructura molecular parecida (Figura 10) la cual consiste en 4 cadenas de carbono ancladas a un amonio cuaternario cargado positivamente; en el caso del BAC una de estas cadenas es un metilbenceno. La presencia del grupo aromático implica que el BAC pueda interactuar con los grupos difenilo de la fase TRB-35, cosa que podría explicar la notable diferencia observada en la capacidad de extracción para ambos compuestos.

Aplicación al análisis de superficies

Los QACs son ampliamente utilizados como agentes de limpieza en la industria alimentaria, sobre todo en la higienización de superficies que están en contacto con alimentos (Koo et al., 2013). Por ello se evaluó la posibilidad de aplicar el procedimiento descrito para la determinación de restos de QACs en superficies. Con esta finalidad, se depositaron sobre una superficie de vidrio 10 μ L de disoluciones patrón de DDAC de diferentes concentraciones, de manera que la masa de DDAC se encontraba en el rango de 0.18 a 3.62 μ g. Seguidamente, se muestreó frotando durante 15-20 s con un hisopo de algodón, una zona de aproximadamente 1 cm² alrededor de la gota de DDAC. Después del muestreo, el hisopo se introdujo en un tubo de vidrio que contenía 1 mL de disolución derivatizante, tal y como se ha descrito previamente (Sección 3.5.4). Previamente al muestreo, el hisopo se puso en contacto con una disolución tampón 1M de acetato a pH 5.4.

Al contrario de lo observado en disolución, al muestrear superficies solo se observó el color azul característico del complejo formado en el extremo del hisopo en contacto con la superficie muestreada. En la Figura 83E puede verse el hisopo obtenido después de muestrear 1 cm² de una superficie de vidrio donde previamente se había depositado 3.6 μ g de DDAC, y en la Figura 83F se muestra el hisopo obtenido cuando se volvió a muestrear en la misma superficie. Como se puede observar, no existen diferencias significativas entre el hisopo utilizado en el segundo muestreo y el blanco (Figura 83G). Es decir, todo el DDAC depositado en la superficie de vidrio se había recogido en el primer muestreo.

Por otro lado, la cantidad de DDAC recogido puede ser mayor si se incrementa el área de muestreo. En la Figura 83 (H-J) se muestran los hisopos después de muestrear superficies de 1, 2 y 4 cm² de área fortificada con 3.6 μ g cm⁻² de DDAC. Los resultados obtenidos muestran que a mayor superficie muestreada más intenso es el color azul observado, y por tanto mayor es la sensibilidad. No se encontraron diferencias significativas al analizar superficies de acero, vidrio y PVC.

Cabe destacar que la acumulación del complejo en el extremo del algodón mejora la sensibilidad del procedimiento, pero limita su aplicación al análisis cuantitativo de QACs. Por ejemplo, para una muestra de 1 cm² el LOD para el DDAC visual como detector fue 0.18 µg cm⁻². Sin embargo, se obtuvieron absorbancias similares para concentraciones de 1.8 a 3.6 µg cm⁻² de DDAC. Por tanto, el método propuesto es una potente herramienta para la detección visual de residuos de QACs en superficies.

Comparación con otros métodos

En la Tabla 4 se muestran las principales características de los métodos colorimétricos publicados en la última década para la determinación de QACs junto con los procedimientos propuestos en este apartado. La principal novedad del método basado en la utilización de un hisopo de algodón frente al resto de los métodos incluidos en la Tabla 4 es la simplificación del proceso analítico, ya que el muestreo, la reacción de derivatización y la determinación/medida se realiza en el mismo dispositivo. Como consecuencia, la manipulación de las disoluciones se reduce considerablemente, simplificándose el procedimiento y disminuyendo el tiempo de análisis y coste del mismo. Además, se trata del procedimiento muy adecuado para realizar el análisis in-situ.

Por otra parte, a diferencia de la mayoría de métodos incluidos en la Tabla 55, se ha estudiado la respuesta del método para mezclas de QACs, concluyendo que se trata de un método adecuado para la estimación del contenido total de QACs independientemente de su proporción en la muestra. Esto es de gran relevancia, ya que los métodos descritos en bibliografía para la estimación total del contenido de QACs requieren análisis volumétricos o técnicas instrumentales complejas y caras como LC-MS.

De acuerdo con la información plasmada en la Tabla 55, la sensibilidad del método propuesto es comparable a la alcanzada por el resto de métodos colorimétricos. Únicamente el método basado en la extracción líquido-líquido con cloroformo proporciona un LOD significativamente menor al resto. Aparentemente, los métodos basados en la utilización de NPs de Ag permiten la rápida determinación in-situ de QACs, aunque no permiten su cuantificación. Además, según los propios autores, las NPs de Ag están fuertemente influenciadas por la presencia de aniones que frecuentemente se encuentran en aguas residuales de la industria como cloruros y nitratos.

Tabla 55. Principales características de los métodos colorimétricos propuestos para la determinación de QACs.

QACs	Reactivo	Preparación de la muestra	Intervalo lineal (mg L ⁻¹)	LODs (mg L ⁻¹)	Precisión (RSD, %)	Aplicación	Referencia
CTAB	Patent blue V	Formación del par iónico, extracción con cloroformo y medida de la absorbancia de la fase orgánica	0-1.73	0.011	≤ 6.08	Aguas residuales industriales	Idouhar et al., 2008
CTAB	NET	Formación del complejo y medida directa de la absorción	0.64-64.0	0.96	≤ 3.4 Intradía	Aguas industriales	Ensafi et al., 2009
CTAB, CPB y DTB	CAS-Al CAS-Be	Formación del complejo y medida directa de la absorción	0.07-14.56 0.03-1.15	0.02-0.06 0.009-0.02	≤ 0.98 intradía (n = 3)	Agua y productos cosméticos	Afkhami et al., 2011
DTAB, CTAB, STAB y BZKB	-	Medida de cambios en la absorbancia de NPs de Au por la presencia de QACs	n. d.	0.17-1.54	n. d.	Residuos de detergentes	Zheng et al., 2014a
DTAB, CTAB, BZKB y TTAB	-	Medida de cambios en la absorbancia de NPs de Ag por la presencia de QACs	n. d.	0.17-1.54	n. d.	Residuos de detergentes	Zheng et al., 2014b
TDDBC	Eosina-Y y Tritón X100	Muestreo con hisopo de algodón, extracción con tampón y ultrasónica (15 min) medida de la absorbancia	1.66-29.5	0.52	n. d.	Residuos en superficies	Mousavi et al., 2013
DDAC BAC DOAC	CAS-Al	Muestreo, derivatización y medida en hisopo de algodón	3.62-36.2 3.68-36.8 3.06-30.62	0.8 1.2 1.1	≤ 11 intradía ≤ 17, interdía (n = 10)	Aguas residuales y superficies industriales	Método propuesto
DDAC BAC	CAS-Al	Extracción con IT-SPME, evaporación y medida del complejo formado	n. d.	0.2 0.1	≤ 10 Intradía	n. d.	Método propuesto

n.d. no disponible. NET: negro de eriocromo T.

Con el método propuesto la cantidad de residuos generados es mínima, ya que la derivatización tiene lugar en la superficie del algodón. Los residuos generados durante el análisis de una muestra son 1 mL de la disolución derivatizante, 1 mL de agua y el hisopo. Sin embargo, los procedimientos descritos en la bibliografía requieren grandes cantidades de muestra, reactivo derivatizante y disoluciones tampón; por ejemplo, en el método propuesto por Idouhar et al. (2004) se necesita más de 100 mL de muestra. Además, el método propuesto no utiliza disolventes orgánicos a diferencia de los procedimientos basados en la formación de pares iónicos, LC o volumetrías de dos fases.

Finalmente, cabe destacar que se trata del primer procedimiento específicamente desarrollado para la determinación de QACs totales in-situ. El procedimiento permite la visualización de la respuesta y una estimación semicuantitativa de la concentración de QACs totales sin necesidad de realizar medidas instrumentales, simplemente por comparación con una carta de colores. Si se precisara de mayor exactitud, y dado que el complejo formado se mantiene estable al menos durante 6 horas, se puede transportar al laboratorio para medir la absorbancia. Por tanto, el método propuesto puede ser considerado como una buena opción si se requiere una rápida respuesta, por ejemplo, para ajustar las condiciones operativas de un proceso de limpieza en la industria alimentaria. Cabe destacar que se trata de un procedimiento tan sencillo que podría ser realizado por personal no cualificado.

En caso de que fuera necesario aumentar la sensibilidad podría aplicarse IT-SPME fuera de línea. Ello permite alcanzar LODs inferiores a la mayoría de los procedimientos incluidos en la Tabla 55. Por tanto, se trata de una alternativa sencilla, rápida y sostenible para la preconcentración de este tipo de compuestos.

La Tabla 56 resume las ventajas e inconvenientes de las diferentes técnicas para el análisis de QACs.

Tabla 56. Principales ventajas e inconvenientes de las técnicas propuestas para el análisis de QACs

Técnica	Ventajas	Inconvenientes
Cromatografía líquida	Identificación y cuantificación individual de QACs	Se requiere instrumentación de alto nivel (espectrómetro de masas)
Volumetría	No precisa instrumentación	Procedimiento tedioso Uso de disolventes orgánicos No in-situ
Colorimetría: formación de pares iónicos y extracción con disolventes orgánicos	Alta sensibilidad	Procedimiento tedioso Manipulación de disoluciones y disolventes Largos tiempos de análisis
Colorimetría: formación de complejos coloreados	Rápida	Manipulación de gran cantidad de disoluciones
Colorimetría: con NPs de Ag	Rápida y simple In-situ	No aplicable en presencia de aniones
Colorimetría: muestreo, derivatización y detección en hisopos de algodón.	Simple Muestras líquidas y superficies Bajo consumo de reactivos Pocos residuos generados In-situ	Intervalo lineal de trabajo menor Menos precisión que procedimientos en disolución
IT-SPME	Sencilla Bajo consumo de reactivos Pocos residuos generados	Se requiere evaporar No in-situ

Conclusiones

En la bibliografía se han descrito numerosos procedimientos para la determinación de QACs en el laboratorio. Sin embargo, a pesar del creciente interés por procedimientos in-situ, los métodos propuestos para la determinación de QACs son muy escasos. En este trabajo se ha demostrado la posibilidad de utilizar hisopos de algodón como soporte para muestrear, derivatizar y medir por reflectancia difusa el complejo coloreado formado. Se ha desarrollado un procedimiento analítico que permite la rápida determinación in-situ de QACs en aguas de lavado de la industria alimentaria. Los parámetros analíticos obtenidos son satisfactorios y comparables con los descritos en la literatura para procedimientos basados en la determinación colorimétrica por formación de complejos. Para el muestreo solo hay que sumergir el hisopo en la muestra, no influyendo el volumen en la respuesta analítica. Después de la derivatización, la detección puede realizarse visualmente y con la ayuda de una carta de color se puede estimar la concentración de forma semicuantitativa. Si se precisa una mayor exactitud, el complejo puede ser medido posteriormente en el laboratorio ya que es estable durante 6 horas. Si se requiere de una mayor sensibilidad, puede utilizarse la IT-SPME fuera de línea empleando una columna TRB-35. Además, el procedimiento propuesto puede ser utilizado para la detección de QACs en superficies a niveles de concentración de mg cm^{-2} .

Cabe destacar que es la primera vez que se ha desarrollado un procedimiento específico para la determinación de QACs in-situ que puede ser de utilidad cuando se requiere una respuesta rápida, por ejemplo, durante la optimización de las condiciones operativas de limpieza en la industria. Finalmente, destacar que la sencillez del procedimiento permite que pueda ser aplicado por personal no cualificado, y que está de acuerdo con los principios de la QAV.

4.3.2 Utilización de cenizas de café como sorbente para MEPS

Como se ha mencionado anteriormente, también se ha propuesto la utilización de la MEPS como técnica de extracción para determinar BAC mediante medida espectrofotométrica directa. Como sorbente se propone la utilización de cenizas, concretamente cenizas de café molido. En la literatura se pueden encontrar diferentes estudios sobre la capacidad adsorbente de las cenizas. Este tipo de material se ha utilizado para la eliminación de contaminantes en matrices acuosas, como cationes metálicos (Chiang, Ghyselbrecht, Santos, Meesschaert & Martens, 2012), tintes (Mittal, Jhare, Vardhan & Mittal, 2014; Wang, Huang & Lau, 2016) o compuestos clorados (Luo et al., 2017).

Con el objetivo de contribuir a la caracterización de las cenizas en referencia a su concentración de Fe, adicionalmente al desarrollo del procedimiento de extracción, se ha simplificado el método de referencia para la determinación de hierro en cenizas procedentes de alimentos a través de la obtención de sus cenizas (ISO 5517-:1978, 1978). Este procedimiento se basa en la formación de un complejo coloreado entre el Fe(II) y la o-fenantrolina. Para que la formación del complejo sea cuantitativa y proporcional a la concentración se requiere de un control preciso del pH de la disolución obtenida a partir de las cenizas. Por ello, el método de referencia establece que previamente al análisis, debe realizarse una valoración potenciométrica con acetato de sodio hasta pH 3, y según el resultado obtenido se debe añadir a la muestra una determinada cantidad de acetato de sodio para corregir el pH. El procedimiento desarrollado en el presente trabajo propone eliminar la valoración potenciométrica y utilizar el indicador ácido/base 2-nitrofenol para ajustar el pH in-situ. Con ello se consigue simplificar el procedimiento experimental, y reducir el tiempo de análisis, consumo de muestra y reactivos, así como la cantidad de residuos generados.

Optimización del procedimiento de extracción

En primer lugar se obtuvieron las cenizas inorgánicas a partir de café molido. Para ello se trató el café a 550 °C en una mufla (Ver Sección 3.5.5). Una vez obtenidas las cenizas y enfriadas a temperatura ambiente, se estudió la capacidad adsorbente de este material utilizando BAC como analito representativo. Para ello, se añadieron 800 µL de una disolución patrón de BAC a un tubo eppendorf conteniendo 10 mg de cenizas de café. Seguidamente se dispersaron las cenizas agitando durante 10 s en un vórtex. Una vez las cenizas se habían depositado en el fondo, el sobrenadante se filtró con un filtro de jeringa de nylon de 0.22 µm de tamaño de poro y se registró su espectro UV-vis.

En la Figura 85, se muestra el espectro de absorción obtenido para una disolución patrón de BAC de concentración 200 µg mL⁻¹ y para la misma disolución recogida al tratarla con cenizas. Como se puede observar, la señal disminuye significativamente cuando se añaden las cenizas, lo que indica que éstas adsorben una buena parte del BAC presente en la muestra. Se estimó por comparación de ambas señales a 270 nm, que aproximadamente el 50 % del BAC quedaba retenido en las cenizas. En la Figura 85, también se muestra el espectro obtenido para un blanco (800 µL de agua nanopura) tratado con cenizas. Los resultados obtenidos indican que con este procedimiento las cenizas no interfieren, y por tanto la señal a 270 nm únicamente depende de la concentración de analito.

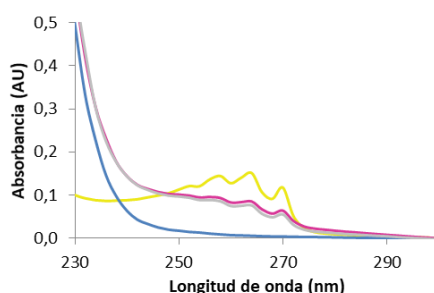


Figura 85. Espectros de absorción UV para una disolución patrón de 200 mg L⁻¹ de BAC (amarillo), dos réplicas de la misma disolución tratada con cenizas (morado y gris), y agua nanopura (azul).

Las cenizas inorgánicas contienen carbonatos y óxidos metálicos como Ca_2CO_3 , Fe_2O_3 , SiO_2 , TiO_2 , Al_2O_3 , CaO , MgO , P_2O_5 , cuya proporción varía según el producto de partida (Luo et al., 2017). Cuando son tratadas con agua, el pH es básico debido a la gran cantidad de carbonatos presentes lo que producirá la hidrólisis de parte de los óxidos convirtiendo parte de las cenizas en partículas cargadas negativamente, las cuales interaccionan fuertemente con las cargas positivas del BAC. Esto explicaría que el tensioactivo quede retenido sobre la superficie de las partículas metálicas (Luo et al., 2017; Wang et al., 2016). Se han elegido cenizas de café cuyo contenido en Fe y Al no son elevados para favorecer la negatividad de las cenizas.

En primer lugar se planteó la posibilidad de empaquetar el material sorbente en cartuchos de SPE. Esta opción se descartó debido a la elevada presión que había que ejercer para hacer fluir la muestra. Como alternativa se optó por compactar la ceniza dentro de una jeringa, concretamente, en la parte que conecta la aguja con la jeringa desechable, utilizando una pequeña cantidad de algodón a modo de frita para evitar la pérdida de las cenizas (Sección 3.3.3). Se utilizó una cantidad muy pequeña de algodón a fin de miniaturizar el dispositivo.

Seguidamente, se optimizaron el volumen de muestra y la cantidad de cenizas utilizadas para la extracción. En la Sección 3.3.3 se describe detalladamente la preparación de dicho dispositivo y el procedimiento seguido para la extracción del BAC, indicando las condiciones óptimas. Se seleccionó 250 μL de metanol como el volumen óptimo de extractante, puesto que era la cantidad mínima para poder medir la absorbancia, además de conseguir una mayor preconcentración. También se verificó que con 250 μL de metanol se extraía el analito prácticamente de forma cuantitativa.

Para optimizar la cantidad de cenizas se comparó la señal analítica obtenida al extraer una disolución de BAC de concentración 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, empleando 10 mg y 20 mg de cenizas. Como se puede observar en la Figura 86A, al utilizar 20 mg de cenizas no se pudo distinguir la señal del analito de la del fondo (cenizas). Ello es debido a que con el metanol se extrajeron componentes de las cenizas que interfieren. Cuando se utilizaron 10 mg de sorbente la cantidad de estos interferentes era menor, no perturbando en la medida. Se tomó 10 mg como la cantidad óptima de sorbente.

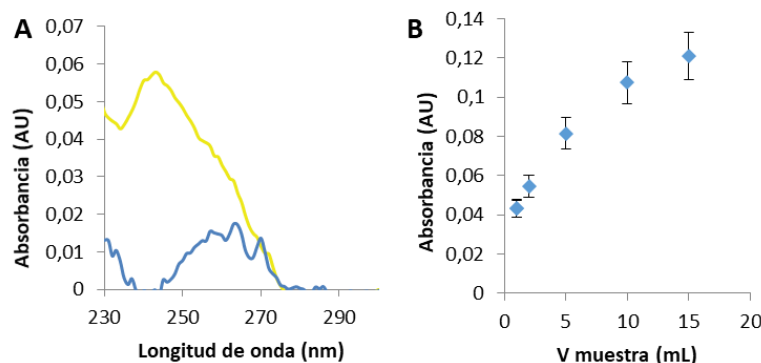


Figura 86. A) Espectros de absorción obtenidos al tratar una disolución de BAC de concentración 5 mg L^{-1} con 10 mg (azul) y 20 mg (amarillo) de cenizas; B) Influencia en la absorbancia del volumen de disolución de BAC (200 mg L^{-1}) procesado por el dispositivo MEPS propuesto, ($n=3$).

Para la optimización del volumen de muestra se procesaron diferentes volúmenes de una disolución de BAC de concentración $200 \mu\text{g mL}^{-1}$. En la Figura 86B, se representa la señal obtenida a 270 nm frente al volumen de muestra procesado. Como se puede observar, la señal analítica se incrementó a medida que aumentaba el volumen de muestra. No obstante, se seleccionó 10 mL como el volumen de muestra óptimo como compromiso entre la sensibilidad y el tiempo necesario para procesar la muestra.

Finalmente, el dispositivo de extracción desarrollado se aplicó al control de formulaciones industriales de detergentes que contienen BAC en su composición. Concretamente, se seleccionó el producto QUACIDE MC7, cuya composición de BAC se sitúa en el rango de 0.5 a 5 %, según el fabricante. En la Figura 87, se muestra el espectro de absorción obtenido para una dilución al 0.5 % del detergente (5 mg L^{-1}) y para la misma muestra procesada por el sistema MEPS propuesto. Como se puede observar, al aplicar el procedimiento de extracción la señal se incrementa aproximadamente 4 veces, permitiendo la determinación de BAC en la muestra. El LOD estimado para este compuesto fue 2.5 mg L^{-1} . Este valor es suficientemente elevado, teniendo en cuenta que permite la determinación directa del tensioactivo sin necesidad de derivatizarlo. Por tanto, se puede afirmar que el procedimiento de extracción propuesto es útil para el control de la composición de detergentes que contengan BAC.

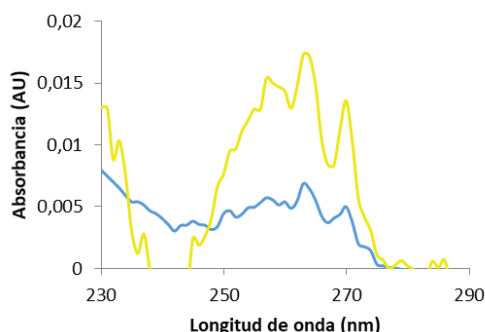


Figura 87. Espectro de absorción UV obtenido para una muestra de detergente (azul) y para la misma muestra procesada por el sistema MEPS propuesto (amarillo).

Simplificación del procedimiento de determinación de hierro en cenizas

Los parámetros obtenidos con el procedimiento propuesto y el método de referencia se muestran en la Tabla 87. El intervalo lineal para ambos métodos se estableció entre 0 y 4.6 mg L⁻¹ de hierro, y el LOD se estimó en 0.02-0.03 mg L⁻¹. Se aplicó un test estadístico de comparación de rectas (Andrade-Garda et al., 2013). Los resultados obtenidos indican que ambas rectas son idénticas (poseen la misma pendiente y ordenada en el origen).

Tabla 57. Parámetros analíticos para los dos métodos comparados.

Método	Recta calibrado ($y = a + bx$) ¹			S _{xy}
	$a \pm s_a$	$b \pm s_b$	R ²	
Valoración NaAc	$(3.0 \pm 1.1) \cdot 10^{-3}$	0.1969 ± 0.0004	0.999986	0.0019
Ajuste pH con 2-nitrofenol	$(4.4 \pm 0.7) \cdot 10^{-3}$	0.1963 ± 0.0002	0.999994	0.0012

¹ Establecido con 8 concentraciones en el intervalo de 0 a 4.6 mg L⁻¹ de hierro.

En la Tabla 57, se muestran el contenido de hierro obtenido al analizar 4 muestras de cenizas con el método de la volumetría con acetato y el método que emplea 2-nitrofenol para ajustar el pH. Como se puede observar, el contenido en hierro obtenido por ambos procedimientos es similar para la misma muestra, después de aplicar el test t de comparación de valores. Por tanto se puede afirmar que los resultados obtenidos mediante ambos procedimientos son estadísticamente equivalentes para un nivel de confianza del 95 %.

Tabla 58. Resultados obtenidos al aplicar el procedimiento de valoración con tampón acetato de la suspensión de las cenizas en agua y el método propuesto de ajuste in-situ del pH.

Cenizas	Concentración de Fe (mg Kg ⁻¹) ¹	
	Valoración con acetato	Ajuste in-situ del pH con 2-nitrofenol
Copos de Maíz	68.8 ± 0.4	68.5 ± 0.4
Café	57.4 ± 1.6	58 ± 2
Cacao en polvo	140.3 ± 1.1	139.7 ± 1.0
Paté	45.1 ± 1.8	44.9 ± 1.3

¹Valores representados como media ± desviación estándar (n = 3).

El contenido de hierro obtenido para la muestra de copos de maíz es estadísticamente equivalente ($P = 0.95$) al valor indicado por el fabricante (70 mg Kg⁻¹). Sin embargo, para el cacao en polvo se obtuvo un resultado estadísticamente inferior ($P = 0.95$) al declarado por el fabricante (147 mg Kg⁻¹). La concentración de hierro encontrada para la muestra de café está de acuerdo con los resultados reportados por otros autores. Por ejemplo, Pohl et al. (2013) analizaron diferentes variedades de café obteniendo un contenido de hierro que oscilaba en el rango de 12.0 a 617.0 mg Kg⁻¹. Finalmente, el contenido de hierro encontrado en el paté de hígado de cerdo es consistente con los valores reportados por USDA National Nutrient Database for Standard Reference, (2011).

La repetitividad obtenida fue satisfactoria de acuerdo con los estándares de calidad definidos para ese nivel de concentraciones. Por ejemplo, la legislación europea (R (CE) n° 152/2009 de la Comisión, de 27 de enero de 2009) establece que para el análisis de muestras alimentarias la diferencia entre los resultados obtenidos para dos determinaciones realizadas simultáneamente a la misma muestra y con el mismo procedimiento no debe ser superior a 5 mg Kg⁻¹, en valor absoluto, para contenidos de analito inferiores a 50 mg Kg⁻¹. Para concentraciones de hierro entre 50 y 100 mg Kg⁻¹ se permite una variación del 10 %, mientras que para concentraciones de 100 mg Kg⁻¹ a 200 mg Kg⁻¹ se permite una diferencia de 10 mg Kg⁻¹ y un 5 % de variación para concentraciones de analito superiores a 200 mg Kg⁻¹.

La máxima diferencia entre los resultados obtenidos para dos réplicas analizadas con el procedimiento basado en el ajuste in-situ del pH fue 0.8 mg Kg⁻¹ para los copos de maíz, 4.1 mg Kg⁻¹ para la muestra de café, 2.0 mg Kg⁻¹ para el cacao en polvo, y 2.3 mg Kg⁻¹ para el paté de hígado de cerdo. Estos valores son muy inferiores a los máximos permitidos por la normativa europea, ya que en el peor de los casos la diferencia es un 68 % menor que el límite legislado. Por tanto, se puede afirmar que la repetitividad obtenida con este procedimiento cumple con la legislación.

Por otro lado, las diferencias máximas obtenidas entre dos réplicas aplicando el método basado en la volumetría previa con acetato de sodio fue 0.8 mg Kg⁻¹ para los copos de maíz, 3.2 mg Kg⁻¹ para la muestra de café, 2.2 mg Kg⁻¹ para el cacao en polvo y 3.2 mg Kg⁻¹ para la muestra de pate de hígado de cerdo. Para este procedimiento la diferencia entre dos réplicas fue, en el peor de los casos, un 64 % menor que la diferencia máxima permitida por la legislación. Por tanto, se puede concluir que el procedimiento que hace uso de la volumetría también proporciona una satisfactoria repetitividad.

Se evaluó la recuperación empleando el método que hace uso del 2-nitrofenol para ajustar el pH in-situ. La cantidad de hierro añadido, los valores encontrados y la recuperación obtenida (n = 2) se muestran en la Tabla 59. Como se puede observar, independientemente de la muestra, todos los valores de recuperación están próximos al 100 %. La media total de las recuperaciones fue (101 ± 5) %; este valor es comparable a los valores obtenidos con otros procedimientos propuestos para la determinación de hierro en matrices similares (Tee et al., 1989).

Tabla 59. Recuperaciones obtenidas aplicando el procedimiento de ajuste del pH in-situ con 2-nitrofenol. Se muestran los valores para cada una de las 2 réplicas.

Cenizas	Fe añadido (µg)	Fe encontrado (µg)	Recuperación (%)
Copos de Maíz	232	225, 254	97, 109
Café	232	229, 237	98, 102
Cacao soluble	232	234, 247	101, 106
Paté	232	231, 223	100, 96
Media global			101 ± 5¹

¹Media ± desviación estándar de las recuperaciones obtenidas para todas las muestras.

Después de realizar las medidas de absorbancia se midió el pH de las disoluciones de muestra con el fin de comparar los resultados con los obtenidos mediante el método volumétrico. Cuando se utilizó el indicador ácido base para ajustar el pH, el valor de pH medio obtenido fue (3.47 ± 0.07). Por otro lado, el pH medio calculado fue de (3.83 ± 0.35) al utilizar la volumetría con acetato de sodio.

Estos resultados indican que el uso combinado de 2-nitrofenol para ajustar el pH a 4.0 - 4.5 y tampón ácido cítrico/citrato es la mejor opción, ya que presenta una alta capacidad amortiguadora a pH = 3.5 ($pK_{a1} = 3.13$; $pK_{a2} = 4.76$; $pK_{a3} = 6.4$ (Budavari, 1989)) respecto a la capacidad amortiguadora del tampón ácido acético/acetato ($pK_{a1} = 4.74$ (Budavari 1989)). Por todo ello, se puede concluir que el método propuesto es una buena alternativa para ajustar el pH.

Finalmente, se estudió si la matriz interfería en la determinación del contenido de hierro. Para ello, se aplicó el método de adición estándar en las cuatro muestras utilizadas a lo largo de todo el estudio (Tabla 60).

Tabla 60. Parámetros de las rectas del método de adición estándar ($n = 6$, cantidad de hierro encontrada en cada muestra).

Cenizas	$a \pm s_a$	$b \pm s_b$	R^2	Fe (mg Kg^{-1}) ¹
Copos de maíz	0.2794 ± 0.0014	0.1944 ± 0.0009	0.99996	69.5 ± 0.8
Café	0.22133 ± 0.0012	0.1970 ± 0.0006	0.99998	57.4 ± 0.7
Cacao soluble	0.558 ± 0.002	0.1968 ± 0.0014	0.99990	141.8 ± 1.8
Paté	0.1878 ± 0.0015	0.1980 ± 0.0007	0.99997	45.8 ± 0.7

¹expresado como media \pm desviación estándar

Para una confianza del 95 % las pendientes de las rectas de calibrado y las rectas de adición estándar eran equivalentes. Además, las concentraciones de hierro establecidas en las muestras por el método de adición de patrón (Tabla 60) fueron estadísticamente equivalentes a las cuantificadas empleando la calibración externa (Tabla 58) para un nivel de significación del 95 %. Por todo ello, se concluyó que el método no está afectado de efecto matriz.

Conclusiones

En este apartado se ha desarrollado un procedimiento basado en MEPS para la extracción y la preconcentración de BAC. El dispositivo desarrollado utiliza cenizas de café como sorbente. Los resultados obtenidos indican que se trata de un procedimiento adecuado para la extracción de este QAC de disoluciones acuosas. La sensibilidad obtenida es adecuada ($LOD = 2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) teniendo en cuenta que la determinación se realizó directamente sin derivatización. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el uso de cenizas como sorbente, además de ser una opción sostenible, es una buena alternativa a los sorbentes tradicionales, para la extracción de analitos con carga positiva.

Por otro lado, se ha demostrado que el uso del indicador ácido-base 2-nitrofenol para ajustar el pH en la determinación de hierro en cenizas con o-fenantrolina es una alternativa simple y rápida al procedimiento de referencia, ya que se elimina la valoración previa con acetato de sodio. El método propuesto permite un mejor ajuste del pH de la disolución de medida. La exactitud y la repetitividad obtenidas con el procedimiento propuesto son comparables con las obtenidas con el método de referencia. Además, el método no está afectado de efecto matriz.

CHAPTER 5. GENERAL CONCLUSIONS

The present thesis has been intended to establish new analytical methodologies for miniaturizing and simplifying analytical processes following the current trends of Green Analytical Chemistry. More specifically, it has been devoted to the development of new approaches for microextraction, mainly in-tube solid-phase microextraction (IT-SPME), that can be used for both on-line coupled to miniaturized liquid chromatographic systems, such as capillary liquid chromatography (CapLC) and nanoliquid chromatography (NanoLC), and off-line before measurement, as well as for microextraction in packed syringe (MEPS). As regards miniaturized LC, different materials have been synthesized and explored as sorbents for IT-SPME, including materials compatible with different separation modalities such as reversed and hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC). Additionally, different configurations have been explored to facilitate the implementation of IT-SPME-NanoLC. In some cases the microextraction techniques have been used in combination with spectometric analysis. The final goal has been to develop simplified methodologies that can be used with a minimum sample treatment (including in-situ or non-invasive procedures) while maintaining high levels of sensitivity and accuracy, and better sustainability. The proposed methodologies have been applied to different compounds of interest in the analysis of environmental samples such as water, soil and plants, as well as to wastes generated by wastewater treatment plants or by the industry.

The main topics considered throughout the thesis are summarized below.

IT-SPME-CapLC

Different extractive phases for IT-SPME coupled on-line to CapLC have been explored. Firstly, commercially available columns of polydimethylsiloxane (PDMS) containing 5, 20, 35 and 50 % of polydiphenyl groups (TRB-5, TRB-20, TRB-35 and TRB-50, respectively) have been tested for the extraction of the biocides diuron and irgarol®-1051 in water samples using diode array detection (DAD). The proposed method provides satisfactory analytical performance; the sensitivity attainable is suitable to assess water quality according to the European legislation for these compounds. The method has been applied to the analysis of water samples collected at different harbours of the Comunitat Valenciana region (Spain). Furthermore, the carbon finger print (CFP) of the method has been estimated and compared with those of other methods proposed for these compounds, being the proposed assay more ecofriendly.

A method for the analysis of triazinic herbicides and their degradation products have been developed using IT-SPME-CapLC(DAD). For the extraction, commercial available TRB-5 columns have been used. The effect of the modification of the extractive coating with carboxilated carbon nanotubes (c-CNTs), both single wall (c-SWCNTs) and multiwall (c-MWCNTs), on the extraction efficiency has been evaluated. Best results for a majority of the analytes were achieved with the unmodified TRB-5 column, which was selected for the analysis. The analytical performance of the method was adequate for monitoring the target compounds in environmental waters, according to the concentration limits established by European legislation for these kind of samples.

A PDMS based column coating with a higher percentage of diphenyl (TRB-35, 35 %) has been functionalized with c-SWCNTs y c-MWCNTs. The synthesized phases have been tested for the extraction of different heterocyclic nitrogen compounds and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), and the results have been compared with those obtained with TRB-5 coatings unmodified and functionalized with c-CNTs. Best results for the PAHs and some triazines have been obtained with the c-SWCNTs-TRB-5, whereas the c-MWCNTs-TRB-35 has provided the best extraction efficiencies for piriprofen.

Additionally, a new polymer of tetraethyl orthosilicate (TEOS) and trimethoxyethylsilane (MTEOS) has been synthesised and used as a coating of silica capillaries which have been subsequently used for IT-SPME-CapLC-DAD. The results have been compared with those obtained with the same polymer doped with SiO₂ NPs, as well as with different commercial columns coated with PDMS and FFAP phases. The sorbents have been used for the extraction of different kind of pesticides in water and soil samples. Best results were obtained with the SiO₂ NPs reinforced TEOS-MTEOS polymers, because the NPs increase the active surface area and allow other interactions (dipole-dipole, hydrogen bonding...) with the analytes complementary to the hydrophobic interactions that are predominant with the TEOS-MTEOS.

Finally, a TEOS-MTEOS phase has been reinforced with TiO₂ NPs and the results have been compared with those obtained with the TEOS-MTEOS-SiO₂ NPs extractive phase, as well with some commercial phases such as TRB, FFAP and PS-DVB. In this case the targets were some aromatic compounds with different number of aromatic rings in their chemical structure and, thus, covering a wide range of polarities. For the most polar compound saccharine TEOS-MTEOS modified with NPs provides the highest extraction efficiency due to the additional electrostatic interaction that can be established between the NPs and the analyte. For naphthalene and fluoranthene a PS-DVB phase leads to best results as π - π interactions are predominant. This phase has been used for the analysis of PAHs in environmental waters and soil by IT-SPME-CapLC-FD.

IT-SPME-nanoLC

Different PDMS based columns (both unmodified or reinforced with CNTs and SiO₂ NPs) of dimensions appropriate to be coupled on-line to NanoLC have been used for the extraction of some triazines and their degradation products. The results have been compared with those obtained for similar extractive columns in IT-SPME-CapLC. Although the presence of CNTs has similar effect of the extraction efficiency in both systems with respect to the unmodified coatings, the responses were higher in the NanoLC system. Best results were obtained with a coating reinforced SiO₂ NPs. This phase has been then selected for the analysis of triazines with satisfactory analytical performance, and applied to the analysis of triazines in water samples and struvite.

A polymeric phase of TEOS-MTEOS doped with TiO_2 NPs has been synthesized and used for the extraction of some organophosphorus and phenylurea herbicides by IT-SPME-NanoLC-DAD. The results have been compared with those obtained with a SiO_2 NPs reinforced TEOS-MTEOS phase. The TiO_2 modified phase provided the best results for a majority of the target compounds, although the phase doped with SiO_2 NPs is more effective for retaining compounds with nitro groups such as fenitrothion and bifentox.

In a further study, TEOS-MTEOS has been doped with several types of NPs (Ag, Au, SiO_2 , Al_2O_3 , ZrO_2 , TiO_2 , CuO, ZnO and Fe_2O_3) and tested for phenylurea herbicides of different polarity. Although Ag and SiO_2 NPs reinforced phases enhance considerably the extraction of some of the analytes, best results have been obtained with the CuO NPs for the most polar herbicides, whereas the TiO_2 NPs doped phase provides the best extraction efficiency for the less polar compounds. The effect of combining different kinds of NPs within the same coating or coupling in series two capillaries with CuO NPs and TiO_2 NPs, respectively, has been also tested. The later approach is superior as it increases the analytical signals by factors up to 30, making possible the detection of most analytes in environmental waters at sub $\mu\text{g L}^{-1}$ levels.

Taking advantage of the high extraction efficiency attainable for polar compounds, a IT-SPME-NanoLC-DAD system with two capillaries coupled in series has been used to study the degradation of tribenuron-methyl (TBM) both under hydrolytic conditions and photoinduced; the study has been extended to the main degradation products of the herbicide. Due to the minimum sample manipulation involved, the proposed method avoids underestimated results derived from the degradation of TBM during the sample treatment. The proposed protocol has been applied to establish the degradation rate of this herbicide in different environmental samples

The importance of minimizing sample treatments has been also illustrated through the development of a non-invasive procedure for the determination of chlorophyll a in plants. The procedure only entails the direct measurement of the reflectance diffuse on leaves and the subsequent treatment of the spectra by the HPCIM method. The proposed approach has been applied to evaluate chlorophyll a in leaves of plants exposed to different herbicides. The results shown that the method is advantageous over a previously reported (invasive) method that has been used as a reference, and it is a valuable tool to assess the health of plants.

Because of its potential for the extraction of highly polar compounds, a TEOS-MTEOS phase doped with CuO NPs has been explored for IT-SPME-NanoLC-DAD under HILIC conditions, as this modality is better suited for the separation of polar analytes. The experimental conditions have been optimized for the separation of the amino acids tyrosine and tryptophan, being the analytical performance comparable to that reported by other methods that involve chemical derivatization. The method has been applied to the determination of ovalbumin (after hydrolysis) in waste water generated by a food industry.

A new polymer of 4-vinylphenylboronic acid and divinylbenzene containing the boronate moiety has been synthesised and tested for the extraction of highly polar compounds. This phase has been used in IT-SPME coupled to NanoLC for the analysis of pesticides of different chemical families in order to evaluate the interaction mechanisms involved in the extraction. It has been found that the extraction is mainly the result of the combination of π - π , hydrogen bonding and Lewis acid-base interactions. The extraction efficiencies obtained by using the new monolithic phase are between 4 and 18 times higher than those attained with a TEOS-MTEOS-TiO₂ phase.

Off-line IT-SPME and MEPS

Different off-line approaches have been tested for the microextraction of some quaternary ammonium compounds (QACs).

First, a colorimetric procedure has been validated for the determination of QACs that uses cotton swabs to integrate sampling, derivatization and measurement. The proposed approach allows the determination of the total content of QACs in water samples at mg L⁻¹ concentration levels. The procedure can also be applied in-situ for a semiquantitative analysis, or to detect traces of QACs on surfaces. The method has been applied to the analysis of QACs in waste waters generated by a dairy industry in the course of a cleaning process.

An off-line IT-SPME protocol has been developed to increase the sensitivity in those cases where the direct measurement is not suitable. This has been the option selected for the analysis of benzalkonium chloride (BAK), being the limit of detection one order the magnitude lower than that attainable through the direct measurement in solution.

The employment of wastes as sorbents has been explored for the microextraction of polar compounds such as QACs. In this case, coffee ashes have been used for the extraction of BAK from aqueous matrices. A new device has been developed that allows the direct detection of BAK under a MEPS format. The sensitivity reached is suitable for the analysis of this surfactant in industrial products. Additionally, for a better characterization of the ashes, a simplification of the reference method for the determination of iron in this kind of samples has been developed.

REFERENCIAS

- Abdel-Rehim, M. (2004) New trend in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications. *J. Chromatogr. B*, 801, 317-321.
- Afkhami, A., Nematollahi, D., Madrakian, T. y Hajihadi, M. (2011) Spectrometric determination of cationic surfactants based on their effect on the complex of Chrome Azurol S with Be^{+2} and Al^{+3} . *Clean-soil Air Water*, 39, 171-176.
- Ahmadi, M., Elmongy, H., Madrakian, T. y Abdel-Rehim, M. (2017) Nanomaterials as sorbents for sample preparation in bionalysis: A review. *Anal. Chim. Acta*, 958, 1-21.
- Aklaghi, Y., Ghaffari, S., Attar, H. y Hoor, A.A. (2015) A rapid hydrolysis method and DABS-Cl derivatization for complete amino acid analysis of octreotide acetate by reversed phase HPLC. *Amino Acids*, 4, 2255-2263.
- Al-Rifai, A., Aqel, A., Al-Wahibi, L., Al-Othman, Z. y Badjah-Hadj A. (2018) Carbon nanotube-based benzyl polymethacrylate composite monolith as a sorbent and a stationary phase material for simultaneous extraction and analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon in water. *J. Chromatogr. A*, 1535, 17-26.
- Ali Omar, M.M., Elbashir, A.A. y Schmitz, O.J. (2017) Capillary electrophoresis method with UV-detection for analysis of free aminoacids concentrations in food. *Food Chem.*, 214, 300-307.
- Almeida, A.C., Gomes, T., Langford, K., Thomas, K.V. y Tollefsen, K.E. (2019) Oxidative stress potential of the herbicides bifenox and metribuzin in the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquat. Toxicol.*, 210, 117-128.
- Alpert, A.J. (1990) Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J. Chromatogr. A*, 499, 177-196.

- Anasta, P.T. y Warner, J.C. (1998) Green Chemistry: theory and practice, *Oxford University Press*, Oxford.
- Andrade-Garda, J.M., Carlosena-Zubieta, A., Soto-Ferrero, R.M., Teran-Baamonde, J. y Thompson, M. (2013) Chapter 2: Classical linear regresión by the least squares method. En J.M. Andrade-Garda (ed.), *Basic chemometric techniques in atomic spectroscopy*, 52-122, Cambridge, United Kingdom: Royal Society of Chemistry.
- Ansari, S. y Karimi, M. (2017) Recent progress, challenges and trends in trace determination of drug analysis using molecularly imprinted solid-phase microextraction technology. *Talanta*, 164, 612-625.
- Argente-García, A., Hakobyan, L., Guillem, C. y Campíns-Falcó, P. (2019) Estimating diphenylamine in gunshot residues from a new tool for identifying both inorganic and organic residues in the same sample. *Separations*, 6, 16.
- Argente-García, A., Moliner-Martínez, Y., López-García, E., Campíns-Falcó, P. y Herráez-Hernández, R. (2016) Application of carbon nanotubes modified coatings for the determination of amphetamines by in-tube solid-phase microextraction and capillary liquid chromatography. *Separations*, 3, 7.
- Arthur, C.L., Pawliszyn, J. (1990) Solid-phase microextraction with thermal desorption using fused silica fibers. *Anal. Chem.*, 62, 2145-2148.
- Aturki, Z., D'Orazio, G., Rocco, A., Si-Ahmed, K. y Fanali, S. (2011) Investigation of polar stationary phases for the separation of sympathomimetic drugs with nano-liquid chromatography in hydrophilic interaction liquid chromatography mode. *Anal. Chim. Acta*, 685, 103-110.

- Aydoğın, C. (2018) Chiral separation and determination of amino acids enantiomers in fruit juice by open-tubular nano liquid chromatography. *Chirality*, 30, 1144-1149.
- Azzaouz, A., Kailasa, S.A., Lee, S.S., Rascón, A.J., Ballesteros, E., Zhang, M. y Kim, K.H. (2018) Review of nanomaterials as sorbent in solid-phase extraction for environmental samples. *Trac-Trends Anal. Chem.*, 108, 347-369.
- Bagheri, H., Ayazi, Z., Es'haghi, A. y Aghakhani, A (2012) Reinforced polydiphenylamine nanocomposite for microextraction in packed syringe of various pesticides. *J. Chromatogr. A*, 122, 13-21.
- Bagheri, H. y Roostaie, A. (2015) Roles of inorganic oxide nanoparticles on extraction efficiency of electrospun polyethylene terephthalate nanocomposite as an unbreakable fiber coating. *J. Chromatogr. A*, 1375, 8-16.
- Ballester-Caudet, A., Campíns-Falcó, P., Pérez, B., Sancho, R., Lorente, M., Sastre, G. y González, C. (2019) A new tool for evaluating and/or selecting analytical methods: summarizing the information in a hexagon. *Trac-Trends Anal. Chem.*, 118, 538-547.
- Banitava, M.H., Davarani, S.S.H. y Pourahadi, A. (2013) Solid-phase microextraction of phthalate esters from aqueous media by electrophoretically deposited TiO₂ nanoparticles on a stainless steel fiber. *J. Chromatogr. A*, 1283, 1-8.
- Bapat, G., Labade, C., Chaudhari, A. y Zinjarde, S. (2016) Silica nanoparticles based techniques for extraction and degradation of pesticides. *Adv. Colloid Interface. Sci.*, 237, 1-14.

- Barahona, F., Díaz-Álvarez, M., Turiel, E. y Martín-Esteban, A. (2016) Molecularly imprinted polymer-coated hollow fiber membrane for the microextraction of triazines directly from environmental waters. *J. Chromatogr. A*, 1442, 12-18.
- Barchanska, H., Kowalska, A. y Poloczeck, B. 2014 Extraction procedures for the study of phytotoxicity and degradation processes of selected triketones in a water ecosystem. *Environ. Sci. Pollut. R.*, 21, 4751-4758.
- Beloti, L.G.M., Miranda, L.F.C. y Queiroz, M.E.C. (2019) Butyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate monolith for online in-tube SPME-UHPLC-MS/MS to determine chlorpromazine, clozapine, quetiapine, olanzapine, and their metabolites in plasma. *Molecules*, 24 (2) 310.
- Bonasea, R.I., Amé, M.V. y Wunderlin, D.A. (2013) Determination of priority pesticides in water samples combining SPE and SPME coupled to GC-MS. A case study: Suquia river basin (Argentina). *Chemosphere*, 90, 1860-1869.
- Bosch-Reig, F. y Campíns-Falcó, P. (1988) H-point standard additions method part 1 fundamentals and application to analytical spectroscopy. *Analyst*, 113, 1011-1016.
- Bossi, R., Vejrup, K. y Jacobsen, C.S. (1999) Determination of sulfonylurea degradation products in soil by liquid chromatography-ultraviolet detection followed by confirmatory liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 855, 575-582.
- Bottaro, M., Frascarolo, P., Gosetti, F., Mazzucco, E., Gianotti, V., Polati, S., Pollici, E., Piacentini, L., Pavese, G. y Gennaro, M.C. (2008) Hydrolytic and photoinduced degradation of tribenuron-methyl studied by HPLC-DAD-MS/MS. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 19, 1221-1229.

- Boumba, V.A., Rallis, G.N. y Vougiouklakis, T. (2017) Poisoning suicide with ingestion of the pyrethroids alpha-cypermethrin and deltamethrin and the antidepressant mirtazapine: a case report. *Forensic Sci. Int.*, 274, 75-78.
- Brander, S.M., Gabler, M.K., Fowler, N.L., Connon, R.E. y Schlenk, D. (2016) Pyrethroid pesticides as endocrine disruptors: molecular mechanisms in vertebrates with a focus on fishes. *Environ. Sci. Technol.*, 50, 8977-8992.
- Brothier, F. y Pichon, V. (2013) Immobilized antibody on a hybrid organic-inorganic monolith: capillary immunoextraction coupled on-line to nanoLC-UV for the analysis of microcystin-LR. *Anal. Chim. Acta*, 792, 52-58.
- Budavari, S. (Ed.). (1989) *The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biological*. Rahway, EE.UU.: Merck
- Campíns-Falcó, P., Herráez-Hernández, R. y **Serra-Mora, P.** (2018). Liquid chromatography-instrumentation. En P. Worsfold, A. Townshend y C. Poole (ed), *Encyclopedia of Analytical Science 2nd edition* (pp 205-213), Ámsterdam, Holanda: Elsevier.
- Campíns-Falcó, P., Herráez-Hernández, R., Verdú-Andrés, J. y Cháfer-Pélicas, C. (2009) On-line determination of aliphatic amines in water using in-tube solid-phase microextraction-assisted derivatisation in in-valve mode for processing large sample volumes in LC. *Anal. Bioanal. Chem.*, 394, 557-565.
- Campíns-Falcó, P., Verdú-Andrés, J., Sevilano-Cabeza, A., Herráez-Hernández, R., Molins-Lagua, C. y Moliner-Martínez, Y. (2010) In-tube solid-phase microextraction coupled by in valve mode to capillary LC-DAD: improving detectability to multiresidue organic pollutants analysis in several whole waters. *J. Chromatogr. A*, 1227, 2695 – 2702.

- Campíns-Falcó, P., Verdú-Andrés, J., Sevillano-Cabeza, A., Molins-Legua, C. y Herráez-Hernández, R. (2008) New micromethod combining miniaturized matrix solid-phase dispersion and in-tube in-valve solid-phase microextraction for estimating polycyclic aromatic hydrocarbons in bivalves. *J. Chromatogr. A*, 1211, 13-21.
- Cañero, A.I., Cox, L., Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E., Hermosín, M.C. y Cornejo, J. (2011) Effect of the herbicides terbutylazine and glyphosate on photosystem II photochemistry of young olive (*Olea europaea*) plants. *J. Agric. Food. Chem.*, 59, 5528-5534.
- Caspar, A.T., Meyer, M.R., Westphal, F., Weber, A.A. y Maurer, H.H (2018) Nano liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry for the identification of metabolites of the two new psychoactive substances N-(ortho-methoxybenzyl)-3,4-dimethoxyamphetamine and N-(ortho-methoxybenzyl)-4-methylmethamphetamine. *Talanta*, 188, 111-123.
- Castillo-García, M.L., Aguilar-Caballos, M.P. y Gómez-Hens, A. (2016) Nanomaterials as tools in chromatographic methods. *Trac-Trends Anal. Chem.*, 82, 385-393.
- Cháfer-Pericás, C., Campíns-Falcó, P. y Prieto-Blanco, M.C. (2008) Automatic in-tube SPME and fast liquid chromatography: A cost-effective method for the estimation of dibutyl and di-2-ethylhexyl phthalates in environmental water samples. *Anal. Chem. Acta*, 610, 268-273.
- Chang, S.K.C. y Zhang, Y. (2017) Protein analysis. En S.S. Nielsen (Ed), *Food Analysis* (pp. 315-331). Cham, Suiza: Springer.

- Chen, C.W., Hsu, W.C., Lu Y.C., Weng, J.R. y Feng, C.H. (2018) Determination of parabens using two microextraction methods coupled with capillary liquid chromatography-UV detection. *Food Chem.*, 241, 411-418.
- Chen, L., Wang, D., Zhang, W., Wang, F., Zhang, L., Wang, Z., Li, Y., Zhou, Z. y Diao, J. (2019) Ecological risk assessment of alpha-cypermethrin-treated food ingestion and reproductive toxicity in reptiles. *Ecotox. Environ. Safe.*, 171, 657-664.
- Chen, Y., Wang, K., Liu, Y., Yang, H., Yao, S., Chen, B., Nie, L. y Xu, G. (2013) Improved sulfoalkylbetaine-based organic-silica hybrid monolith for high efficient hydrophilic interaction liquid chromatography of polar compounds. *Electrophoresis*, 34, 1877-1885.
- Cheng, C. y Chang, K.C. (2016) Sensitive analysis of phthalate esters in plastic bottled water via on-line capillary solid-phase microextraction liquid chromatography electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Anal. Methods*, 8, 3910-3919.
- Chiang, Y.W., Ghyselbrecht, K., Santos, R.M., Meesschaert, B. y Martens, J.A. (2012) Synthesis of zeolitic-type adsorbent material from municipal solid waste incinerator bottom ash and its application in heavy metal adsorption. *Catal. Today*, 190, 23-30.
- Chowdhary, S., Bhattacharyya, R. y Banerjee, D. (2014) Acute organophosphorous poisoning. *Clin. Chim. Acta*, 431-66-76.
- Costa-Queiroz, M.E., Donizeti de Souza, I. y Marchioni, C. (2019) Current advances and applications of in-tube solid-phase microextraction. *Trac-Trends Anal. Chem.*, 111, 261-278.

- Croft, H., Chen, J.M. y Zang, Y. (2014a) The applicability of empirical vegetation indices for determining leaf chlorophyll content over different leaf and canopy structures. *Ecol. Complex.*, 17, 119-130.
- Croft, H., Chen, J.M. y Zang, Y. (2014b) Temporal disparity in leaf chlorophyll content and leaf area index across a growing season in a temperate deciduous forest. *Int. J. Appl. Earth. Obs.*, 33, 312-320.
- Çevikkalp, S.A., Löker, G.L., Yaman, M. y Amoutzopoulos, B. (2016) A simplified HPLC method for determination of tryptophan in some cereals and legumes. *Food Chem.*, 193, 26-29.
- Černigoj, U., Gašperšič, J., Fichtenbaun, A. Kranjnc, N.L., Vidič, J., Mitulovič, G. y Štrancar, A. (2016) Titanium dioxide nanoparticle coating of polymethacrylate-based chromatographic monoliths for phosphopeptides enrichment. *Anal. Chim. Acta*, 942, 146-154.
- Dayan, F.E. y Duke, S.O. (2010) Protoporphyrinogen oxidase-inhibition herbicides, R. Krieger (Ed.), Hayes' Handbook of Pesticides Toxicology, Elsevier, San Diego, CA, pp 1733-1751.
- Djozan, D., Ebrahimi, B., Mahkam, M. y Farajzadeh, M.A. (2010) Evaluation of a new method for chemical coating of aluminum wire with molecularly imprinted polymer layer. Application for the fabrication of triazines selective solid-phase microextraction fiber. *Anal. Chim. Acta*, 674, 40-48.
- Dong, B., Qian, W. y Hu, J. (2015) Dissipation kinetics and residues of florasulam and tribenuron-methyl in wheat ecosystem. *Chemosphere*, 120, 486-491.
- Du, P., Wu, X., Xu, J., Dong, F., Liu, X. y Zheng, Y. (2018) Effects of trifluralin on the soil microbial community and functional groups involved in nitrogen cycling. *J. Hazard. Mater.*, 353, 204-213.

- Eisert, R. y Pawliszyn, J. (1997) Automated in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. *Anal. Chem.*, 69, 3140-3147.
- Ellison, S.L.R., Rosslein, M. y Williams, A. (1995) In EURACHEM/CITAC guide, quantifying uncertainty in analytical measurement, 1st ed, Teddington, UK.
- Ensafi, A.A., Hemmateenejad, B. y Barzegar, S. (2009) Non-extraction flow injection determination of cationic surfactants using eriochrome Black-T. *Spectrochim. Acta A*, 73, 794-798.
- Ensie, B. y Samad, S. (2014) Removal of nitrate from drinking water using nano SiO₂-FeOOH-Fe core-shell. *Desalination*, 347, 1-9.
- Espina-Benítez, M.B., Randon, J., Demesmay, C. y Dugas, V. (2017) Back to BAC: Insights into boronate affinity chromatography interaction mechanisms. *Sep. Purif. Rev.*, 47, 214-228.
- Eto, M. (2018) *Organophosphorous pesticides*, Boca Raton, FL, USA, CRC Press.
- Fang, G., Chen, J., Wang, J., He, J. y Wang, S. (2010) N-Methylimidazolium ionic liquid-functionalized silica as sorbent for selective solid-phase extraction of 12 sulfonylurea herbicides in environmental water and soil samples. *J. Chromatogr. A*, 1217, 1567-1574.
- Faria, H.D., Abrão, L.C.C., Santos, M.G., Barbosa, A.F. y Figueiredo, E.C. (2017) New advances in restricted access materials for sample preparation: A review. *Anal. Chim. Acta*, 959, 43-65.
- Feng, J., Sun, M., Liu, H., Li, J., Liu, X. y Jiang, S. (2010) Au nanoparticles as novel coating for solid-phase microextraction. *J. Chromatogr. A*, 1217, 8079-8086.

- Feng, J., Tian, Y., Wang, X., Luo, C. y Sun, M. (2018) Basalt fibers functionalized with gold nanoparticles for in-tube solid-phase microextraction. *J. Sep. Sci.*, 41, 1149-1155.
- Feng, J., Wang, X., Tian, Y., Luo, C. y Sun, M. (2017) Poly(ionic-liquids)-coated stainless-steel wires packed into a polyether ketone tube for in-tube solid-phase microextraction. *J. Sep. Sci.*, 40, 4773-4779.
- Feng, J., Wang, X., Tian, Y., Luo, C. y Sun, M. (2018) Basalt fibers grafted with a poly(ionic liquids) coating for in-tube solid-phase microextraction. *J. Sep. Sci.*, 41, 3267-3274.
- Fernandes, C., Figueira, E., Tauler, R. y Bedia, C. (2018) Exposure to chlorpyrifos induces morphometric, biochemical and lipidomic alterations in Green beans (*Phaseolus vulgaris*). *Ecotox. Environ. Safe.*, 156, 25-33.
- Fernandes, T.C., Mazzeo, D.E. y Marín-Morales, M.A. (2009) Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent trifluralin herbicide. *Ecotox. Environ. Safe.*, 72, 1680-1686.
- Fernández-Amado, M., Prieto-Blanco M.C., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S. y Prada-Rodríguez, D. (2017) A comparative study of extractant and chromatographic phases for the rapid and sensitive determination of six phthalates in rainwater samples. *Chemosphere*, 175, 52-65.
- Ferrer, I. y Barceló, D. (1999) Simultaneous determination of antifouling herbicides in marine water samples by on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Cromatogr. A*, 854, 197-206.

- Fonseca, B.M., Cristóvão, A.C. y Alves, G. (2018) An easy-to-use liquid chromatography method with fluorescence detection for the simultaneous determination of five neuroactive amino acids in different regions of rat brain. *J. Pharmacol. Tox. Met.*, 91, 72-79.
- Frankhauser-Noti, A. y Grob, K. (2007) Blank problems in trace analysis of diethylhexyl and dibutyl phthalate: investigation of the sources, tips and tricks. *Anal. Chim. Acta*, 582, 353-360.
- Galán-Malo, P., López, M., Ortiz, J.C., Pérez, M.D., Sánchez, L., Razquin, P. y Mata, L. (2017) Detection of egg and milk residues on working surfaces by ELISA and lateral flow immunoassay tests. *Food Control*, 74, 45-53.
- Gałaszka, A., Migaszewski, Z. y Namieśnik, J. (2013) The 12 principles of green analytical chemistry and the significance mnemonic of green analytical practices. *Trac-Trends Anal. Chem.*, 50, 78-84.
- Gatidou, G., Kotrikla, A., Thomaidis, N. y Lekkas, T.D. (2005) Determination of the antifouling booster biocides irgarol 1051 and diuron and their metabolites in sea water by high performance liquid chromatography-diode array detector. *Anal. Chim. Acta*, 528, 88-99.
- Gatidou, G., Stasinakis, A.S. y Iatrou, E.I. (2015) Assessing single and joint toxicity of three phenylurea herbicides using *Lemna minor* and *Vibrio fischeri* bioassays. *Chemosphere*, 119-supplement, S69-S74.
- Gimeno, R.A., Aguilar, C., Marcé, R.M. y Borull, F. (2001) Monitoring of antifouling agents in water samples by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 915, 139-147.

Giraldez, I., Chaguaceda, E., Bujalance, M. y Morales, E. (2013) Determination of five booster biocides in seawater by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1271, 17-26.

González-Fuenzalida, R.A., Jornet-Martínez, N., Herráez-Hernández, R. y Campíns-Falcó, P. (2019) Nanomaterials for sample preparation in LC-MS bioanalysis. En L. Wenkui, J. Wenying y F. Yunlin (ed), *Sample preparation in LC-MS bioanalysis* (pp 128-138), Hoboken, N.J., EE.UU.: John Wiley & Sons

González-Fuenzalida, R.A., López-García, E., Moliner-Martínez, Y. y Campíns-Falcó, P. (2016) Adsorbent phases with nanomaterials for in-tube solid-phase microextraction coupled on-line to liquid nanochromatography. *J. Chromatogr. A*, 1432, 17-25.

González-Fuenzalida, R.A., Moliner-Martínez, Y., Molins-Lagua, C., Parada-Artigues, V., Verdú-Andrés, J. y Campíns-Falcó, P. (2016) New tools for characterizing metallic nanoparticles: AgNPs, a case study. *Anal. Chem.*, 88, 1485-1493.

González-Fuenzalida, R.A., Moliner-Martínez Y., Prima-García, H., Ribera, A., Campíns-Falcó, P. y Zaragoza, R. (2014) Evaluation of superparamagnetic silica nanoparticles for extraction of triazines in magnetic in-tube solid phase microextraction coupled to capillary liquid chromatography. *Nanomaterials*, 4, 242-255.

- Grueiro-Noche, G., Fernández-Laespada, M.E., Pérez-Pavón, J.L., Moreno-Cordero, B. y Muniategui-Lorenzo, S. (2011) Microextraction by packed sorbent for the analysis of pharmaceutical residues in environmental water samples by in situ derivatization-programmed temperature vaporizer-gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1218, 9390-9396.
- Gure, A., Lara, F.J., Moreno-González, D., Megersa, N., del Olmo-Iruela, M. y García-Cacmpaña, A.M. (2014) Salting-out assisted liquid-liquid extraction combined with capillary HPLC for the determination of sulfonylurea herbicides in environmental water and banana juice samples. *Talanta*, 127, 51-58.
- Hakobyan, L., Pla-Tolos, J., Moliner-Martínez, Y., Molins-Legua, C., Ruíz-Ramon, J., Gordon, M., Ramírez-Gallymore, P. y Campíns-Falcó, P. (2018) Determination of meropenem in endotracheal tubes by in-tube solid phase microextraction coupled to capillary liquid chromatography with diode array detection. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 151, 170-177.
- Han, H., Wang, Q., Liu, X. y Jiang, S. (2012) Polymeric ionic liquid modified organic-silica hybrid monolithic column for capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A*, 1246, 9-14.
- Hashemi, B., Zohrabi, P. y Shamsipur, M. (2018) Recent developments and applications of different sorbents for SPE and SPME from biological samples. *Talanta*, 187, 337-347.
- Hayes, J.D. y Malik, A. (2000) Sol-gel monolithic columns with reversed electroosmotic flow for capillary electrochromatography. *Anal. Chem.*, 72, 4090-4099.

- Helbig, M., Zahn, S., Böttcher, K., Rohm, H. y Majschak, J.P. (2019) Laboratory methods to predict the cleaning behaviour of egg yolk layers in flow channel. *Food Bioprod. Process.*, 113, 108-117.
- Hijosa-Valsero, M., Bécares, E., Fernández-Aláez, C., Fernández-Aláez, M., Mayo, R. y Jiménez, J.J. (2016) Chemical pollution in inland shallow lakes in the Mediterranean region (NW Spain): PAHs, insecticides and herbicides in water and sediments. *Sci. Total Environ.*, 544, 797-810.
- Hostovsky, M., Blahova, J., Plhalova, L., Kopriva V. y Svobodova, Z. (2015) Effects of the exposure of fish to triazine herbicides. *Neuroendocrinol. Lett.*, 35, 2, 3-25.
- Hovárth, C.G., Preiss, B.A. and Lipsky, S.R. (1967) Fast liquid chromatography. Investigation of operating parameters and the separation of nucleotides on pellicular ion exchange. *Anal. Chem.*, 39, 1422-1428.
- Hu, H., Zhang, Y., Zhang, Y., Huang, X. y Yuan, D. (2014) Preparation of a new sorbent based on boronate affinity monolith and evaluation of its extraction performance for nitrogen-containing pollutants. *J. Chromatogr. A*, 1342, 5-15.
- Hu, X., Tanaka, A. y Tanaka, R. (2013) Simple extraction methods that prevent the artificial conversion of chlorophyll to chlorophyllide during pigment isolation from leaf samples. *Plant Methods*, 9:19.
- Hu, Y., Wang, Y., Hu, Y. y Li, G. (2009) Liquid-liquid-solid microextraction based on membrane-protected molecularly imprinted polymer fiber for trace analysis of triazines in complex aqueous samples. *J. Chromatogr. A*, 1216, 8304-8311.

- Huang, L.F., Jia, B., Jiang, L., Liu, W.L., Xia, L.Y. y Lv, Y.K. (2018) Preparation of restricted-access material precolumns by grafting γ -gluconolactone onto a hybrid silica monolithic column for on-line solid-phase extraction of tetracycline residues from milk. *J. Sep. Sci.*, 42, 843-850.
- Huang, S.D., Huang, H.I. y Sung, Y.H. (2004) Analysis of triazine in water samples by solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography. *Talanta*, 64, 887-893.
- Huang, X., Zhu, X. y Pei, M. (2018) Solid-phase microextraction of sulfonylurea herbicides by using borate-reinforced multiple monolithic fibers. *Microchim. Acta*, 185, 226.
- Huntington, J.A. y Stein, P.E. (2001) Structure and properties of ovalbumin. *J. Chromatogr. A*, 1432, 17-25.
- Idkowiak, J., Zgoła-Grzeńkowiak, A., Karbowska, B., Plackowski, R. y Wyrwas, B. (2017) Determination of cationic surfactants in soil samples by the disulphine blue active substance (DBAS) procedure. *J. Anal. Chem.*, 72, 745-750.
- Idouhar, M. y Tazerouti, A. (2008) Spectrometric determination of cationic surfactants using patent blue V: application to the waste water industry in Algiers. *J. Surfactants Deterg.*, 11, 263-267.
- Inukai, T., Kaji, S. y Kataoka, H. (2018) Analysis of nicotine and cotinine in hair by on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry as biomarkers of exposure to tobacco smoke. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 156, 272-277.
- Invest, J.F. y Lucas, J.R. (2008) Pyriproxyfen as a mosquito larvicide. W.H. Robinson, D. Bajomi (Eds.) *Proceedings of the sixth international conference on urban pests*, pp. 239-245.

- Ishii, D., Asai, K., Hibi, K., Jonokuchi, T. and Nagaya, M. (1977) A study of micro-high-performance liquid chromatography: I. Development of technique for miniaturization of high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 144, 157-168.
- Ishizaki, A., Uemura, A. y Kataoka, H. (2017) A sensitive method to determine melatonin in saliva by automated online in-tube solid-phase microextraction coupled with stable isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Methods*, 9, 3134-3140.
- ISO 5517:1978 (1978) Fruit and vegetable products – determination of iron content – 1,10-phenanthroline photometric method. *International Organization for Standardization*, Switzerland.
- Jandera, P. y Janás, P. (2017) Recent advances in stationary phases and understanding of retention in hydrophilic interaction chromatography. A review. *Anal. Chim. Acta*, 967, 12-32.
- Janhot, S., Griffiths, P., Watanes, R. y Watanes, S. (2004) Enhancement of lac dye adsorption on cotton fibers by poly(ethyleneimine). *Dyes Pigments*, 63, 231-237.
- Janků, S., Komendová, M. y Urban, J. (2016) Development of an online solid-phase extraction with liquid chromatography method based on polymer monoliths for the determination of dopamine. *J. Sep. Sci.*, 39, 4107-4115.
- Jeong, N.C.; Lee, T.S., Tae, E.L., Lee, Y.L. y Yoon, K.B. (2008) Acidity scale for metal oxides and Sanderson's electronegativities of lanthanide elements. *Angew. Chem. Int. Edit.*, 47, 10128-10132.

- Ji, C., Yu, C., Yue, S., Zhang, Q., Yan, Y., Fan, J. y Zhao, M. (2019) Enantioselectivity in endocrine disrupting effects of four cypermethrin enantiomers based on *in vitro* models. *Chemosphere*, 220, 766-773.
- Jiménez, L., De la Cruz, J., Carballo, A. y Domench, J. (2011) Enfoques metodológicos para el cálculo de la Huella de Carbono. *Obs. La sostenibilidad en España*.
- Jinno, K., Nakagawa, K., Saito, Y., Ohta, H., Nagashima, H., Itoh, K., Archer, J. y Chen, Y.L. (1995) Nano-scale design of novel stationary phases to enhance selectivity for molecular shape and size in liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 691, 91-99.
- Jornet-Martínez, N., Moliner-Martínez, Y., Herráez-Hernández, R., Molins-Legua, C., Verdú-Andrés, J. y Campíns-Falcó, P. (2016) Designing solid optical sensors for in situ passive discrimination of volatile amines based on a new one-step hydrophilic PDMS preparation. *Sensor Actuat. B-Chem.*, 223, 333-342.
- Jornet-Martínez, N., Muñoz-Ortuño, M., Moliner-Martínez, Y., Herráez-Hernández, R. y Campíns-Falcó, P. (2014) On-line in-tube solid phase microextraction-capillary liquid chromatography method for monitoring degradation products of di-(2-ethylhexyl) phthalate in water. *J. Chromatogr. A*, 1347, 157-160.
- Jornet-Martínez, N., Ortega-Sierra, A., Verdú-Andrés, J., Herráez-Hernández, R. y Campíns-Falcó, P. (2018) Analysis of contact traces of cannabis by in-tube solid-phase microextraction coupled to nanoliquid chromatography. *Molecules*, 23, 2359.
- Jubert, C. y Bailey, G. (2007) Isolation of chlorophylls a and b from spinach by counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A*, 114, 95-110.

- Kaewprasit, C., Hequet, E., Abidi, N. y Gurlot, J.P. (1998). Application of methylene blue adsorption to cotton fiber specific surface area measurement: Part 1, methodology. *J. Cotton Sci.*, 2, 164-173.
- Kartsova, L.A., Bessonova, E.A. y Somova, V.D. (2019) Hydrophilic interaction chromatography. *Anal. Chem.*, 74, 415-424.
- Kataoka, H., Itano, M., Ishizaki, A. y Saito, K. (2009) Determination of nicotine, cotinine, and related alkaloids in human urine and saliva by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1216, 3746-3750.
- Kataoka, H., Mizuno, K., Oda, E. y Saito, A. (2016) Determination of the oxidative stress biomarker urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 1019, 140-146.
- Kip, Ç., Demir, G. y Tuncel, A. (2017) One pot synthesis of carboxyl functionalized-polyhedral oligomeric siloxane based monolith via photoinitiated thiol-methacrylate polymerization for nano-hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1502, 14-23.
- Konieczka, P. y Namiesnik, K. (2010) Estimating uncertainty in analytical procedures based on chromatographic techniques. *J. Chromatogr. A*, 1217, 882-891.
- Koo, O., Martin, E.M., Story, R., Lindsay, D., Ricke, S.C. y Crandall, P.G. (2013) Comparison of cleaning fabrics for bacterial removal from food-contact surface. *Food Control*, 30, 292-297.

- Kozlik, P., Goldman, R. y Sanda, M. (2018) Hydrophilic interaction liquid chromatography in the separation of glycopeptides and their isomers. *Anal. Bioanal. Chem.*, 410, 5001-5008.
- Kragulj, M., Tričković, J., Dalmacija, B., Kukovecz, Á., Kóya, Z., Molnar, J. y Rončević, S. (2013) Molecular interactions between organic compounds and functionally modified multiwalled carbon nanotubes. *Chem. Eng. J.*, 225, 144-152.
- Lam, K.H., Cai, Z.W., Wai, H.Y., Tsang, V.W.H., Lam, M.H.W., Cheung, R.Y.H., Yu, H.X. y Lam, P.K.S. (2005) Identification of a new irgarol-1051 related s-triazine species in coastal waters. *Environ. Pollut.*, 136, 221-230.
- Lambropoulou, D.A., Sakkas, V.A. y Albanis, T.A. (2002) Headspace solid phase microextraction for the analysis of the new antifouling agents Irgarol 1051 and Sea Nine 211 in natural waters. *Anal. Chim. Acta*, 468, 171-180.
- Lartigues, S. y Garrigues, P.P. (1995) Degradation kinetics of organophosphorous and organonitrogen pesticides in different waters under various environmental conditions. *Environ. Sci. Technol.*, 29, 1246-1254.
- Lashgari, M. y Yamini, Y. (2019) An overview of the most common lab-made coating materials in solid phase microextraction. *Talanta*, 191, 283-306.
- Lee, S., Kumar, R. y Jeon, B.H. (2016) Struvite precipitation under changing ionic conditions in synthetic wastewater: experiment and modeling. *J. Colloid Interface Sci.*, 474, 93-102.
- Lhotská, I., Kholová, A., Machyňáková, A., Hroboňová, K., Solich, P., Švec, F. y Šatínský, D. (2019) Preparation of citrinin-selective molecularly imprinted polymer and its use for on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.*, 411, 2395-2404.

- Li, K., Zhao, S., Zhang, D., Peng, M., Wang, Y., Gou, G. and Wang, X. (2019) In-tube solid-phase microextraction capillary column packed with mesoporous TiO₂ nanoparticles for phosphopeptide analysis. *Electrophoresis*, 40, 1-7.
- Li, L., Wang, J., Zhou, S. y Zhao, M. (2008) Development and characterization of an immunoaffinity monolith for selective on-line extraction of bisphenol A from environmental water samples. *Anal. Chim. Acta*, 620, 1-7.
- Li, M., Li, D., Tai, Y., Gu, C., Song, Y., Jiao, W., Ning, J., Wei, C., Gu, X., Ho, C.T., Ddin, J.U. y Wang, X. (2017) Determination of free aminoacids in tea by a novel method of reverse phase high performance liquid chromatography applying 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinamide carbamate reagent. *J. Food Sci. Technol.*, 55, 4276-4286.
- Li, T., Xu, J., Wu, J.H. y Feng, Y.Q. (2009) Liquid-phase deposition of silica nanoparticles into a capillary for in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1216, 2989-2995.
- Li, X., Kuroki, H., Funatsu, T. y Tsunoda, M. (2018) Retention of fluorescent amino acid derivatives in ion-pairing reversed-phase liquid chromatography. *Anal. Sci.*, 34, 1209-1212.
- Liang, Y., Zhou, S., Hu, L., Li, L., Zhao, M. y Liu, H. (2010) Class-specific immunoaffinity monolith for efficient on-line clean-up of pyrethroids followed by high-performance liquid chromatography analysis. *J. Chromatogr. B*, 878, 278-282.
- Lin, B., Li, T., Zhao, Y., Huang, F.K., Gou, L. y Feng, Y.Q. (2008) Preparation of a TiO₂ nanoparticle-deposited capillary column by liquid phase deposition and its application in phosphopeptide analysis. *J. Chromatog. A*, 1192, 95-102.

- Lin, S.H., Hsu, J.W. y Fuh, M.R. (2019) Simultaneous determination of nitrate and nitrite in vegetables by poly(vinylimidazole-co-ethylene dimethacrylate) monolithic capillary liquid chromatography with UV detection. *Talanta*, 205, 120082.
- Ling, X., Zou, L. y Chen, Z. (2017) Polymer monolith column composited with multiwalled carbon nanotubes- β -cyclodextrin for the selective extraction of psoralen and isopsoralen. *J. Sep. Sci.*, 40, 3718-3724.
- Liu, C., Li, H., Wang, Q., Crommen, J., Zhou, H. y Jiang, Z. (2017) Preparation and evaluation of 400 μm i.d. polymer-based hydrophilic interaction chromatography monolithic columns with high column efficiency. *J. Chromatogr. A*, 1509, 83-90.
- Liu, D., Pacepavicius, G.J., Maguire, R.J., Lau, Y.L., Okamura, H. y Aoyama, I. (1999) Mercuric chloride-catalyzed hydrolysis of the new antifouling compound irgarol 1051. *Water Res.*, 33, 155-163.
- Liu, R. (2017) Compositing the minimum NDVI for MODIS data. *IEEE T Geosci. Remote.*, 55, 1396-1406.
- Liu, Y., Wang, X., Chen, Z., Liang, D.H., Sun, K., Huang, S., Zhu, J., Shi, X., Zeng, J., Wang, Q. y Zhang, B. (2019) Towards a high peak capacity of 130 using nanoflow hydrophilic interaction liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta*, 1062, 147-155.
- Loos, R., Gawlik, B.M., Locoro, G., Rimaviciute, E., Contini, S. y Bidoglio, G. (2009) EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. *Environ. Pollut.*, 157, 561-568.

- Luo, X., Li, G. y Hu, Y. (2017) In-tube solid-phase microextraction based on NH₂-MIL-53(Al)-polymer monolithic column for online coupling with high-performance liquid chromatography for directly sensitive analysis of estrogens in human urine. *Talanta*, 165, 377-383.
- Luo, H., Wu, Y., Zhao, A., Kumar, A., Liu, Y. y Cao, B. (2017) Hydrothermally synthesized porous materials from municipal solid waste incineration bottom ash and their interfacial interactions with chloroaromatic compounds. *J. Clean. Prod.*, 162, 411-419.
- Lv, X., Tan, W., Chen, Y., Chen, Y., Ma, M., Chen, B. y Yao, S. (2016) Facile “one-pot” synthesis of poly(methacrylic acid)-based hybrid monolith via thiol-ene click reaction for hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1454, 49-57.
- Ma, K., Wu, H.Y., Zhang, B., He, X. y Li, B.X. (2015) Neurotoxicity effects of atrazine-induced SH-SY5Y human dopaminergic neuroblastoma cell via microglial activation. *Mol. BioSyst.*, 11, 2915-2924.
- Majors, R.E. (1991) An overview of sample preparation, *LC-GC*, 9, 16-20.
- Mann, K. (2017) Proteomics of egg white. En M. Colgrave (Ed.), *Proteomics in food science* (pp. 261-276). London, United Kingdom: Academic Press.
- Manoudis, P.N., Tsakalof, A., Karapanagiotis, I., Zuburtikudis, I. y Panayiotou, C. (2009) Fabrication of super-hydrophobic surfaces for enhanced stone protection. *Surf. Coat. Technol.*, 203, 1322-1328.
- Marlatt, V.L. y Martyniuk, C.J. (2017) Biological responses to phenylurea herbicides in fish and amphibians: new directions for characterizing mechanisms of toxicity. *Comp. Biochem. Phys. C*, 194, 9-21.

- Marrubini, G., Appeldblad, P., Maietta, M. y Papetti, A. (2018) Hydrophilic interaction chromatography in food matrices analysis: an updated review. *Food Chem.*, 257, 53-66.
- Mashile, G.P., Mpupa, A. y Nomngongo, P.N. (2018) In-syringe micro solid-phase extraction method for the separation and preconcentration of parabens in environmental water samples. *Molecules*, 23, 1450.
- Masini, J.C. y Svec, F. (2017) Porous monoliths for on-line sample preparation: A review. *Anal. Chim. Acta*, 964, 24-44.
- McCalley, D.V. (2017) Understanding and manipulating the separation in hydrophilic interaction liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1523, 49-71.
- Mei, M., Huang, X. y Chen, L. (2019) Recent development and applications of poly (ionic liquid)s in microextraction techniques. *Trac-Trends Anal. Chem.*, 112, 123-134.
- Mei, M., Huang, X., Yang, X. y Luo, Q. (2016) Effective extraction of triazines from environmental water samples using magnetism-enhanced monolith-based in-tube solid phase microextraction. *Anal. Chim. Acta*, 937, 69-79.
- Melo, L.P., Queiroz, R.H.C. y Queiroz, M.E.C. (2011) Automated determination of rifampicin in plasma samples by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, 879, 2454-2458.
- Milne, G.W.A. (2018) CRC Handbook of pesticides. *CRC Pressk*, Boca Ratón, FL, EE.UU.
- Mine, Y. (2015) Egg proteins. En Z. Ustunol (Ed.), *Applied food protein chemistry* (pp. 459-490). Chichester, United Kingdom: John Wiley & Sons.

- Miranda, L.F.C., Gonçalves, R.R. y Queiroz, M.E.C. (2019) A dual ligand sol-gel organic-silica hybrid monolithic capillary for in-tube SPME-MS/MS to determine amino acids in plasma samples. *Molecules*, 24, 9.
- Mittal, J., Jhare, D., Vardhan, H. y Mittal, A. (2014) Utilization of bottom ash a low-cost sorbent for the removal and recovery of a toxic halogen containing dye eosin yellow. *Desalin. Water Treat.*, 1-12
- Miyamoto, T. y Homma, M. (2018) Detection and quantification of D-amino acid residues in peptides and proteins using hydrolysis. *BBA-Proteins Proteom.*, 1866, 775-782.
- Mizuno, K. y Kataoka, H. (2015) Analysis of 8-isoprostane as an oxidative stress biomarker by stable isotope dilution using automated online in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 112, 36-42.
- Moein, M.M., Abdel-Rehim, A. y Abdel-Rehim, M. (2017) Microextraction by paked sorbent (MEPS): Theory, developments and applications. En M. Valcárcel, S. Cárdenas y R. Lucena (Eds.), *Comprehensive Analytical Chemistry* (pp. 241-253). Amsterdam, Países Bajos: Elsevier.
- Moliner-Martínez, Y., Herráez-Hernández, R., Verdú-Andrés, J., Molins-Lagua, C. y Campíns-Falcó, P. (2015) Recent advances of in-tube solid-phase microextraction. *Trac-Trends Anal. Chem.*, 71, 205-213.
- Moliner-Martínez, Y., Molins-Lagua, C., Verdú-Andrés, J., Herráez-Hernández, R. y Campíns-Falcó, P. (2011) Advantages of monolithic over particulate columns for multiresidue analysis of organic pollutants by in-tube solid-phase microextraction coupled to capillary liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1218, 6256-6262.

- Moliner-Martínez, Y., Muñoz-Ortuño, M., Herráez-Hernández, R. y Campíns-Falcó, P. (2014) Rapid analysis of effluents generated by the dairy industry for total reflectance infrared spectroscopy measurement. *Talanta*, 119, 11-16.
- Moliner-Martínez, Y., Prima-García, H., Ribera, A., Coronado, E. y Campíns-Falcó, P. (2012) Magnetic in-tube solid-phase microextraction. *Anal. Chem.*, 84, 7233-7240.
- Moliner-Martínez, Serra-Mora, P, Verdú-Andrés, J., Molins-Lagua, C., Herráez-Hernández, R. y Campíns-Falcó, P. (2017). Application of nanomaterials in solid and liquid microextraction. En M. Valcárcel, S. Cárdenas y R. Lucena (ed), *Analytical microextraction techniques* (pp 135-166), Sharjah, Emiratos Árabes Unidos: Bentham Science Publishers.
- Moreno-González, D., Pérez-Ortega, P., Gilbert-López, B., Molina-Díaz, A., García-Reyes, J.F. y Fernández-Alba, A.R. (2017) Evaluation of nanoflow liquid chromatography high resolution mass spectrometry for pesticide residue analysis in food. *J. Chromatogr. A*, 1512, 78-87.
- Mousavi, Z.E., Butler, F. y Danaher, M. (2013) Validation of a simple spectrophotometric method for the measurements of quaternary ammonium compound residue concentration in food production facility. *Food Anal. Method*, 6, 1265-1270.
- Mousavi, Z.M., Yamini, Y., Karimi, B., Seidi, S. y Khorasani, M. (2019) Imidazolium-based mesoporous organosilicas with bridging organic groups for microextraction by packed sorbent of phenoxy acid herbicides, polycyclic aromatic hydrocarbons and chlorophenols. *Microchim. Acta*, 186, 239.

- Mostafalou, S y Abdollahi, M. (2017) Pesticides: an update of human exposure and toxicity. *Arch. Toxicol.*, 91, 549-599
- Mukherjee, I., Das, T.K., Kumar, A., Satkar, B. y Sharma, K.K. (2015) Behaviour and bioefficacy of tribenuron-methyl in wheat (*Triticum aestivum* L.) under irrigated agro-ecosystem in India. *Environ. Monit. Assess.*, 187, 610.
- Mullett, W.M., Martin, P. y Pawliszyn, J. (2001) In-tube molecularly imprinted polymer solid-phase microextraction for the selective determination of propranolol. *Anal. Chem.*, 73, 2383-2389.
- Muñoz-Ortuño, M., Argente-García, A., Moliner-Martínez, Y., Verdú-Andrés, J., Herráez-Hernández, R., Picher, M.T. y Campíns-Falcó, P. (2014) A cost-effective method for estimating di(2-ethylhexyl)phtalate in coastal sediments. *J. Chromatogr. A*, 1324, 57-62.
- Murray, E., Li, Y., Currivan, S.A., Moore, B., Morrin, A., Diamond, D., Macka, M. y Pauli, B. (2018) Miniaturized capillary ion chromatograph with UV light-emitting diode based indirect absorbance detection for anion analysis in potable and environmental waters. *J. Sep. Sci.*, 41, 3224-3231.
- Murtada, K., Andrés, F., Ríos, A. y Zougagh, M. (2018) A simple poly(styrene-co-divinylbenzene)-coated glass blood spot method for monitoring of seven antidepressants using capillary liquid chromatography-mass spectrometry. *Talanta*, 188, 772-778.
- Nagaraju, D. y Huang, S.D. (2007) Determination of triazine herbicides in aqueous samples by dispersive liquid-liquid microextraction with gas chromatography-ion trap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1161, 89-97.

- Nazario, C.E.D., Silva, M.R., Franco, M.S y Lanças, F.M. (2015) Evolution in miniaturized column liquid chromatography instrumentation and applications: an overview. *J. Chromatogr. A*, 1421, 18-37.
- Nguyen, H.P. y Schug, K.A. (2008) The advantages of ESI-MS detection in conjunction with HILIC mode separations: fundamentals and applications. *J. Sep. Sci.*, 31, 1465-1480.
- Ni, Y., Yang, H., Zhang, H., He, Q., Huang, S., Qin, M., Chai, S., Gao, H. y Ma, Y. (2018) Analysis of four sulfonylurea herbicides in cereals using modified quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe sample preparation method coupled with chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1537, 27-34.
- Nicolopoulou-Stamati, P., Maipas, S., Koampasi, C., Stamatis, P y Hens, L. (2016) Chemical pesticides and human health: the urgent need for a new concept in agriculture. *Front. Public Health*, 4, 148.
- Nikolaou, A., Kostopoulou, M., Lofrano, G. y Meric, S. (2009) Determination of PAHs in marine sediment: analytical methods and environmental concerns. *Global Nest. J.*, 11, 391-405.
- Nisbert, A.D., Saundry, R.H., Moir, A.J., Forthergill, L.A. y Forthergill, J.E. (1981) The complete amino-acid sequence of hen ovalbumin. *Eur. J. Biochem*, 115, 335-334.
- Orton, F., Lutz, I., Kloas, W. y Routledge, E.J. (2009) Endocrine disrupting effects of herbicides and pentachlorophenol: in vitro and in vivo evidence. *Environ. Sci. Technol.*, 43, 2144-2150.

- Ou, J., Lin, H., Zhang, Z., Huang, G., Dong, J. y Zou, H. (2013) Recent advances in preparation and application of hybrid organic-silica monolithic capillary columns. *Electrophoresis*, 34, 126 - 140.
- Pang, J., Liao, Y., Huang, X., Ye, Z. y Yuan, D. (2019) Metal-organic framework-monolith composite-based in-tube solid phase microextraction on-line coupled to high-performance liquid chromatography fluorescence detection for the highly sensitive monitoring of fluoroquinolones in water and food samples. *Talanta*, 199, 499-506.
- Pang, J., Mei, M., Yuan, D. y Huang, X. (2018) Development of on-line monolith-based in-tube solid phase microextraction for the sensitive determination of tiazoles in environmental waters. *Talanta*, 184, 411-417.
- Pang, J., Yuan, D. y Huang, X. (2018) On-line combining monolith-based in-tube solid phase microextraction and high-performance liquid chromatography-fluorescence detection for the sensitive monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in complex samples. *J. Chromatogr. A*, 1571, 29-37.
- Papadopoulos, N.G., Gikas, E., Zalidis, G. y Tsiropoulos, A. (2012) Determination of herbicide terbuthylazine and its major hydroxyl and dealkylated metabolites in constructed wetland sediments using solid phase extraction and high performance liquid chromatography-diode array detection. *Inter. J. Environ. Anal. Chem.*, 92, 1429-1442.
- Passos, H.M., Cieslarova, Z. y Simonato, A.V.C. (2016) CE-UV for the characterization of passion fruit juices provenance by amino profile with the aid of chemometric tool. *Electrophoresis*, 37, 1923-1929.

- Patwardham, S.V., Emami, F.S., Berry, R.J., Jones, S.E., Naik, R.R., Deschaume, O., Heinz, H. y Perry, C.C. (2012) Chemistry of aqueous silica nanoparticles surfaces and the mechanism of selective peptide adsorption. *J. Am. Chem. Soc.*, 134, 6244-6258.
- Pei, X., Zhu y X., Huang, H. (2018) Mixed functional monomers-based monolithic adsorbent for the effective extraction of sulfonylurea herbicides in water and soil samples. *J. Chromatogr. A*, 1531, 13-21.
- Pergal, M.V., Kodranov, I.D., Pergal, M.M., Dojčinović, P., Stanković, D.M., Petković, B.B. y Manojlović, D.D. (2018) Assessment of degradation of sulfonylurea herbicides in water by chlorine dioxide. *Water Air Soil Pollut.*, 229, 287.
- Perucho, J., Gonzalo-Gobernado, R., Bazn, E., Casarejos, M.J., Jiménez-Escrig, A., Asensio, M.J. y Herranz, A.S. (2015) Optimal excitation and emission wavelengths to analyze amino acids and optimize neurotransmitters quantification using precolumn OPA-derivatization by HPLC. *Amino Acids*, 41, 963-973.
- Pichon, V., Combès, A. y Delaunay, N. (2019) Immunosorbents in microextraction. *Trac-Trends Anal. Chem.*, 113, 246-255.
- Pietrzykowski, E., Stone, C., Pinkard, E. y Mohammed, C. (2006) Effects of *Mycosphaerella* leaf disease on the spectral reflectance properties of juvenile *Eucalyptus globulus* foliage. *Forest Pathol.*, 36, 334-348.
- Pohl, P., Stelmach, E., Welna, M. y Szymczycha-Madeja, A. (2013) Determination of the elemental composition of coffee using instrumental methods. *Food Anal. Methods*, 6, 598-613.

- Prieto-Blanco, M.C., Argente-García, A. y Campíns-Falcó, P. (2016) A capillary liquid chromatography method for benzalkonium chloride determination as a component or contaminant in mixtures of biocides. *J. Chromatogr. A*, 1431, 176-183.
- Prieto-Blanco, M.C., Moliner-Martínez, Y. y Campíns-Falcó, P. (2013) Combining poly(dimethyldiphenylsiloxane) and nitrile phases for improving the separation and quantitation of benzalkonium chloride homologues: in tube solid phase microextraction capillary liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry for analyzing industrial samples. *J. Chromatogr. A*, 1297, 226-230.
- Prieto-Blanco, M.C., Peñafiel-Barba, S., Moliner-Martínez, Y. y Campíns-Falcó, P. (2019) Footprint of carbonyl compounds in hand scent by in-tube solid-phase microextraction coupled to nano-liquid chromatography/diode array detection. *J. chromatogr. A*, 1596, 241-249.
- Qi, W., Guang, Q., Sun, T., Coa, Y., Zhang, L. y Guo, Y. (2015) Improving detection sensitivity of amino acids in thyroid tissue by using phthalic acid as a mobile phase additive in hydrophilic interaction chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 870, 75-82.
- Queiroz, M.E.C. y Melo, L.P. (2014) Selective capillary coating materials for in-tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography to determine drugs and biomarkers in biological samples: A review. *Anal. Chim. Acta*, 826, 1-11.
- Queiroz, M.E.C., Souza, I.D. y Marchioni, C. (2019) Current advances and applications of in-tube solid-phase microextraction. *Trac-Trends Anal. Chem.*, 111, 261-278

- Rashaid, A.H.B., Harrington, P.D.B. y Jackson, G.P. (2015) Profiling amino acids of Jordania scalp hair as a tool for diabetes mellitus diagnosis: a pilot study. *Anal. Chem.*, 81, 7078-7084.
- Ratola, N., Santos, L., Herbert, P. y Alves, A. (2006) Uncertainty associated to the analysis of organochlorine pesticides in water by solid-phase microextraction/gas chromatography-electron capture detection—evaluation using two different approaches. *Anal. Chim. Acta*, 573-574, 202-208.
- Rayner, D.E. (2016) Trends in sample preparation. *LCGC North. Am.*, 34, 174-188.
- Rocha, C., Pappas, E.A. y Huang, C. (2008) Determination of trace triazine and chloroacetamide herbicides in tile-fed drainage ditch water using solid-phase microextraction coupled with GC-MS. *Environ. Pollut.*, 152, 239-244.
- Sabik, H., Jeannot, R. y Rondeau, B. (2000) Multiresidue methods using solid-phase extraction techniques for monitoring priority pesticides, including triazines and degradation products, in ground and surface waters. *J. Chromatogr. A*, 885, 217-236.
- Saillenfait, A.M., Sabaté, J.P., Denis, F., Antoine, G., Robert, A., Roudot, A.C., Ndiaye, D. y Eljarrat, E. (2017) Evaluation of the effects of α -cypermethrin on fetal rat testicular steroidogenesis. *Reprod. Toxicol.*, 72, 106-114.
- Saito, A., Hamano, M. y Kataoka, H. (2018) Simultaneous analysis of multiple urinary biomarkers for the evaluation of oxidative stress by automated online in-tube solid-phase microextraction coupled with negative/positive ion-switching mode liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Sep. Sci.*, 41, 2743-2749.

- Saito, K., Uemura, E., Ishizaki, A. y Kataoka, H. (2010) Determination of perfluorooctane sulfonate by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 658, 141-146.
- Saito, Y., Kawazoe, Nakao, Y., Imaizumi, M., Takeichi, T., Kiso, Y. y Jinno, K. (2000) Fiber-in-tube solid-phase microextraction: a fibrous rigid-rod heterocyclic polymer as the extraction medium. *Anal. Chem.*, 368, 641-643.
- Saka, M., Tada, N. y Kamata, Y. (2018) Chronic toxicity of 1,3,5-triazine herbicides in the postembryonic development of the western clawd frog *Silurata tropicalis*. *Ecotox. Environ. Safe*, 147, 373-381.
- Salas, D., Borull, F., Fontanals, N. y Marcé, R.M. (2017) Hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to mass spectrometry-based detection to determine emerging organic contaminants in environmental samples. *Trac-Trends Anal. Chem.*, 94, 141-149.
- Saleh, A., Sheijooni Fumani N. y Molaei, S. (2014) Microfunnel-supported liquid-phase microextraction: application to extraction and determination of Irgarol 1051 and diuron in the Persian Gulf seawater samples. *J. Chromatogr. A*, 1356, 32 - 37.
- Sánchez-Machado, D.I., Chavira-Willys, B. y López-Cervantes, J. (2018) High-performance chromatography with fluorescent detection for quantification of tryptophan and tyrosine in a shrimp waste protein concentrate. *J Chromatogr. B*, 62, 88-93.

- Sánchez-Ort́ega, A., Unceta, N., Ǵomez-Caballero, A., Sampedro, M.C., Akesolo, U., Goicolea, M.A. y Barrio, R.J. (2009) Sensitive determination of triazines in underground waters using stir bar sorptive extraction directly coupled to automated thermal desorption and gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 641, 110-116.
- Śanchez-Rodŕguez, A., Sosa-Ferrera, Z. y Santana-Rodŕguez, J.J. (2011) Applicability of microwave-assisted extraction combined with LC-MS/MS in the evaluation of booster biocide levels in harbor sediments. *Chemosphere*, 82, 96 - 102.
- Sarigöl-Kuliç, Z., Aydin, S., Ündeğ̃er-Bucurgat, Ü. y Bařaran, N. (2018) In vitro genotoxicity assessment of dinitroaniline herbicides pendimethalin and trifluralin. *Food Chem. Toxicol.*, 113, 90-98.
- Sarmah, A.K. y Sabadie, J. (2002) Hydrolysis of sulfonylurea herbicides in soil and aqueous solutions: a review. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 6253-6265.
- Scott, R.P.W. y Kucera, P. (1979) Mode of operation and performance characteristics of microbore columns for use in liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 169, 51-72.
- See, H.H., Sanagi, M.M., Ibrahim, W.A.V. y Naim, A.A. (2010) Determination of triazine herbicides using membrane-protected carbon nanotubes solid phase membrane tip extraction prior to micro-liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1217, 1767-1772.
- řesták, J., Moravcová, D. and Kahle, V. (2015) Instrument platforms for nano liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1421, 2-17.

- Silva, B.J.G., Lanças, F.M. y Queiroz, M.E.C. (2008) In-tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography (in-tube SPME/LC) analysis of nontricyclic antidepressants in human plasma. *J. Chromatogr. B*, 862, 181-188.
- Silva, R.G. y Augusto, F. (2005) Highly porous solid-phase microextraction fiber coating based on poly(ethyleneglycol)-modified ormosil synthesized by sol-gel technology. *J. Chromatogr. A*, 1072, 7-12.
- Silva, R.G., Bottoli, C.B.G. y Collins, C.H. (2012) New silica gel-based monolithic column for nano-liquid chromatography, used in the HILIC mode. *J. Chromatogr. A*, 50, 649-657.
- Simonato, A.V.C., Moraes, E.P., Carrilho, E., Tavares, M.F. y Kenndler, E. (2008) Determination of amino acids by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry: An evaluation of different protein hydrolysis procedures. *Electrophoresis*, 29, 2051-2058.
- Singer, H., Jaus, S., Hankel, I., Lück, A., Hollender, J. y Alder, A.C. (2010) Determination of biocides and pesticides by on-line solid phase extraction coupled with mass spectrometry and their behavior in wastewater and surface water. *Environ. Pollut.*, 158, 3054 - 3064.
- Slimani, K., Féret, A., Pirotais, Y., Maris, P., Abjean, J.P. y Hurtaud-Pessel, D. (2017) Liquid chromatography-tandem mass spectrometry multiresidue method for the analysis of quaternary ammonium compounds in cheese and milk products: development and validation using the total error approach. *J. Chromatogr. A*, 1517, 86-96.

- Soleimani, E., Bahrami, A., Afkhami, A. y Shahna, F.G. (2017) Selective determination of mandelic acid in urine using molecularly imprinted polymer in microextraction by packing sorbent. *Arch. Toxicol.*, 92, 213-222.
- Sombra, L., Moliner-Martínez, Y., Cárdenas, S. y Valcárcel, M. (2008) Carboxylic multi-walled carbon nanotubes as immobilized stationary phase in capillary electrochromatography. *Electrophoresis*, 29, 3850-3857.
- Song, Y., Xu, C., Kuroki, H., Liao, Y. y Tsunoda, M. (2018) Recent trends in analytical methods for the determination of amino acids in biological samples. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 147, 35-49.
- Sonobe, R. y Wang, Q. (2017) Hyperspectral indices for quantifying leaf chlorophyll concentrations performed differently with different leaf types in deciduous forest. *Ecol. Inform.*, 37, 1-9.
- Souza, I.D., Melo, L.P., Jardim, I., Monteiro, J., Nakano, A.M. y Queiroz, M.E. (2016) Selective molecularly imprinted polymer combined with restricted acces material for in-tube SPME/UHPLC-MS/MS of parabens in breast milk samples. *Anal. Chim. Acta*, 932, 49-59.
- Súarez, B., Simonet, B.M., Cárdenas, S. y Valcárcel, M. (2007) Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in urine by combining an immobilized carboxylated carbon nanotubes minicolumn for solid-phase extraction with capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1159, 203-207.
- Suresh Kumar, K., Dahms, H.U., Lee, J.S., Kim, H.C., Lee, W.C. y Shin, K.H. (2014) Algal photosynthetic response to toxic metals and herbicides assessed by chlorophyll a fluorescence. *Ecotox. Environ. Safe.*, 104, 51-71.

- Sun, M., Feng, J., Bu, Y. y Luo, C. (2015) Nanostructured-silver-coated polyetheretheketone tube for online in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography. *J. Sep. Sci.*, 38, 3239-3246.
- Stara, A., Zuskova, E., Kouba, A. y Velisek, J. (2016) Effects of terbuthylazine-desethyl, a terbuthylazine degradation product, on red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *Sci. Total Environ.*, 566-567, 733-740.
- Starner, K., Kuivila, K.M., Jennings, B. y Moon, G.E. (1999) Degradation rates of six pesticides in water from the Sacramento river, California. *US Geological Survey Toxic Substances Hydrology Program-Proccedings Vol 2*, 99-4018B.
- Tan, F., Zhao, C., Li, L., Liu, M. He, X. y Gao, J. (2015) Graphene oxide based in-tube solid-phase microextraction combined with liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of triazine herbicides in water. *J. Sep. Sci.*, 38, 2312-2319.
- Tang, K., Gu, X., Luo, Q., Chen, S., Wu, L. y Xiong, J. (2014) Preparation of molecularly imprinted polymer for use as SPE adsorbent for the simultaneous determination of five sulphonylurea herbicides by HPLC. *Food Chem.*, 150, 106-112.
- Taraji, M., Haddad, P.R., Amos, R.I.J., Talebi, M., Szucs, R., Dolan, J.W. y Pohl, C.A. (2018) Chemometric-assisted method development in hydrophilic interaction liquid chromatography: A review. *Anal. Chim. Acta*, 1000, 20-40.

- Tariba Lovaković, B., Pizent, A., Kašuba, V., Kopjar, N., Micek, V., Mandaš, G., Dvorščak, M., Mikolić, A., Milić, M., Žunec, S., Vrdolijak, A.L. y Želježić, D. (2017) Effects of sub-chronic exposure to terbuthylazine on DNA damage, oxidative stress and parent compound/metabolite levels in adult male rats. *Food Chem. Toxicol.*, 108, 93-103.
- Tee, E.S., Khor, S.C. y Siti-Mizura, S. (1989) Determination of iron in foods by atomic absorption spectrophotometric and colorimetric methods. *Pertanika*, 12, 315-322.
- Teerlink, J., Hernández, J. y Budd, R. (2017) Fipronil washoff to municipal wastewater from dogs treated with spot-on products. *Sci. Total. Environ.*, 599-600, 960-966.
- Themelis, T., Gotti, R. y Gatti, R. (2017) A novel hydrophilic interaction liquid chromatography method for the determination of underivatized amino acids in alimentary supplements. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 145, 751-757.
- Tian, J., Xu, J., Zhu, F., Lu, T., Su, C. y Ouyang, G. (2013) Application of nanomaterials in sample preparation. *J. Chromatogr. A*, 1300, 2-16.
- Truong, L., Gonnerman, G., Simonich, M.T. y Tanguay, R.L. (2016) Assessment of the development and neurotoxicity of the mosquito control larvicide, pyriproxyfen, using embryonic zebrafish. *Environ. Pollut.*, 218, 1089-1093.
- Tousi, F., Bones, J., Hancock, W.S. y Hincapie, M. (2013) Differential chemical derivatization integrated with chromatographic separation for analysis of isomeric sialylated N-glycans: a nano-hydrophilic interaction liquid chromatography-MS platform. *Anal. Chem.*, 85, 8421-8428.

- Tsochatzis, E.D., Begoub, O., Gika, H.G., Karayannakidis, P.D. y Kalogiannis, S (2017) A hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry method for amino acid profiling in mussels. *J. Chromatogr. B*, 1047, 197, 206.
- Tsubouchi, M., Mitsushio, H. y Yamasaki, N. (1991) Determination of cationic surfactants by two-phase titration. *Anal. Chem.*, 53, 1957-1959.
- Tuma, P. y Godja, J. (2015) Rapid determination of branched chain amino acid in human blood plasma by pressure-assisted capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *Electrophoresis*, 36, 1969-1975.
- Unión Europea. Directiva 98/83/CE del Consejo de 3 de noviembre de 1998, relativa a la calidad de las aguas destinadas a consumo humano. Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 5 de diciembre de 1998, núm. 330, pp. 32-54.
- Unión Europea. Directiva 2004/107/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 15 de diciembre de 2004, relativa al arsénico, el cadmio, el mercurio, el níquel y los hidrocarburos aromáticos policíclicos en aire ambiente. Diario Oficial de la Unión Europea, 26 de enero de 2005, núm. 23, pp. 3-16.
- Unión Europea. Reglamento (CE) Nº 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de febrero de 2005, relativa a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la directiva 91/414/CEE del Consejo. Diario Oficial de la Unión Europea, 16 de marzo de 2005, núm. 70, pp. 1-16.

Unión Europea. Reglamento (CE) Nº 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas, y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 199/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) nº 1907/2006. Diario Oficial de La Unión Europea, 31 de diciembre de 2008, núm. 353, pp. 1-1355.

Unión Europea. Reglamento (CE) Nº 152/2009 de la Comisión de 27 de enero de 2009, por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los piensos. Diario Oficial de la Unión Europea, 26 de enero de 2009, núm. 54, pp. 3-123.

Unión Europea. Reglamento (UE) Nº 835/2011 de la Comisión de 19 de agosto de 2011, que modifica el Reglamento (CE) nº 1881/2006 por lo que respecta al contenido máximo de hidrocarburos aromáticos policíclicos en los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea, 20 de agosto de 2011, núm. 215, pp. 4-8.

Unión Europea. Reglamento (UE) Nº 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de octubre de 2011, sobre la información alimentaria facilitada al consumidor y por el que se modifican los Reglamentos (CE) nº 1924/2006 y (CE) nº 1925/2006 del Parlamento Europeo y por el que se derogan la Directiva 87/250/CEE de la Comisión, la Directiva 91/496/CEE del Consejo, la Directiva 199/10/CE de la Comisión, la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, las directivas 2002/67/CE, y 2008/5/CE de la Comisión, y el Reglamento (CE) nº 608/2004 de la Comisión. Diario Oficial de la Unión Europea, 22 de noviembre de 2011, num 304, pp. 18-63.

Unión Europea. Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 12 de agosto de 2013, por el que se modifican las Directivas 200/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas. Diario Oficial de la Unión Europea, 24 de agosto de 2013, núm. 226, pp. 1-17.

Unión Europea. Reglamento (UE) Nº 1119/2014 de la Comisión de 16 de octubre de 2014, que modifica el anexo III del Reglamento (CE) nº 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a los límites máximos de residuos de cloruro de benzalconio y cloruro de didecildimetilamonio en determinados productos. Diario Oficial de la Unión Europea, 23 de octubre de 2014, núm. 304, pp. 43-74.

United States Environmental Protection Agency (2017). National Primary Drinking Water Regulations. Último acceso (septiembre 2019) de www.epa.gov/round-water-and-drinking-water/national-primary-rinking-water-regulations

USDA National Nutrient Database for Standard References. (2011). *Food Composition data base* [base de datos]. Último acceso (septiembre 2019) de ndb.nal.usda.gov/

Wang, C., Zhou, W., Liao, X., Zhang, W. y Chen, Z. (2017) An etched polyether ether ketone tube covered with immobilized graphene oxide for online solid phase microextraction of quaternary alkaloids prior to their quantitation by HPLC-MS/MS. *Microchim. Acta*, 184, 2415-2721.

Wang, S.T., Wang, M.Y., Su, X., Yuang, B.F. y Feng, Y.Q. (2012) Facile preparation of SiO₂/TiO₂ composite monolithic capillary column and its application in enrichment of phosphopeptides. *Anal. Chem.*, 84, 7763-7770.

- Wang, X., Jiang, N., Cai, Z., Li, W., Li, J., Lin, X., Xie, Z., You, L. y Zhang, Q. (2017) Sodium hyaluronate-functionalized urea-formaldehyde monolithic column for hydrophilic in-tube solid-phase microextraction of melamine. *J. Chromatogr. A*, 1515, 54-61.
- Wang, X., Li, X., Li, Z., Zhang, Y., Bai, Y. y Liu, H. (2014) Online coupling of in-tube solid phase microextraction with direct analysis in real time mass spectrometry for rapid determination of triazine herbicides in water using carbon-nanotubes-incorporated polymer monolith. *Anal. Chem.*, 86, 4739-4747.
- Wang, X., Liu, Y., Tau, S. y Xing, B. (2010) Relative importance of multiple mechanism in sorption of organic compounds by multiwalled carbon nanotubes. *Carbon*, 48, 3721-3728.
- Wang, Y., Huang, L. y Lau, R. (2016) Conversion of municipal solid waste incineration bottom ash sorbent material for pollutants removal from water. *J. Taiwan Inst. Chem. E.*, 60, 275-286.
- Wang, Z., Xiao, C., Wu, C. y Han, H. (2000) High-performance polyethylene glycol-coated solid-phase microextraction fibers using sol-gel technology. *J. Chromatogr. A*, 893, 157 - 168.
- Wen, Y., Yuan, X., Qin, F., Zhao, L. y Xiong, Z. (2018) Development and validation of a hydrophilic interaction ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for rapid simultaneous determination of 19 free amino acids in rat plasma and urine. *Biomed. Chromatogr.*, 33, 4387.

- Wu, F., Yang, S., Wang, L., Wei, W. y Ding, C.F. (2019) Simultaneous enrichment and analysis of tobacco alkaloids by microextraction coupled with mass spectrometry using poly (N-isopropyl-acrylamide-co-divinyl-benzene-co-N,N'-methylene diacrylamide) monolithic colum. *Talanta*, 198, 118-127.
- Wu, F., Wang, J., Zhao, Q., Jiang, N., Lin, X., Xie, J., Li, Q. y Zhang, Q. (2017) Detection of trans-fatty acids by high performance liquid chromatography coupled with in-tube solid-phase microextraction using hydrophobic polymeric monolith. *J. Chromatog. B*, 1040, 214-221.
- Wu, F., Xu, C., Jiang, N., Wang, J. y Ding, C.F. (2018) Poly(methacrylic acid-co-diethenyl-benzene) monolithic microextraction column and its application to simultaneous enrichment and analysis of mycotoxins. *Talanta*, 178, 1-8.
- Wu, H., Jin, H., Yuan, G., Crommen, J., Zhang, J. y Wang, Q. (2018) Simultaneous quantification of urea and allantoin in cosmetic products by nano-HPLC using highly hydrophilic monolith. *J. Liq. Chromatogr. R. T.*, 41, 780-785.
- Wu, X., Wang, R., Jiang, Q., Wang, S., Yao, Y. y Shao, L. (2014) Determination of amino acid neurotransmitters in rat hippocampi by HPLC-UV using NBD-F as a derivative. *Biomed. Chromatogr.*, 28, 459-462.
- Xian, Y., Dong, H., Wu, Y., Gou, X., Hou, X. y Wang, B. (2016) QuEChERS-based purification method coupled to ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) to determine six quaternary ammonium compounds (QACs) in dairy products. *Food Chem.*, 212, 96-103.
- Xu, J., Wu, P., Ye, E.C., Yuan, B.F. y Feng, I.Q. (2016) Metal oxides in sample pretreatment. *Trac-Trends Anal. Chem.*, 80, 41-56.

- Yunta, C., Grisales, N., Nász, S., Hemmings, K., Pignatelli, P., Voice, M., Ranson, H. y Paine, M.J.I. (2016) Pyriproxyfen is metabolized by P450s associated with pyrethroid resistance in *An. gambiae*. *Insect Biochem. Molec.*, 78, 50-57.
- Zajickova, Z. (2016) Advances in the development and applications of organic-silica hybrid monolith. *J. Sep. Sci.*, 40, 25-48.
- Zarejousheghani, M., Möder, M. y Borsdorf, H. (2013) A new strategy for synthesis of an in-tube molecularly imprinted polymer-solid phase microextraction device: selective off-line extraction of 4-nitrophenol as an example of priority pollutants from environmental water samples. *Anal. Chim. Acta*, 798, 48-55.
- Zhang, C., Cui, F., Zeng, G.M., Jiang, M., Yang, Z.Z., Yu, Z.G., Zhu, M.Y. y Shen, L.Q. (2015). Quaternary ammonium compounds (QACs): A review on occurrence, fate and toxicity in the environment. *Sci. Total Environ.*, 518-519, 352-362.
- Zhang, Q., Yang, F.Q., Ge, L., Hu, Y.J. y Xia, Z.N. (2017) Recent applications of hydrophilic interaction liquid chromatography in pharmaceutical analysis. *J. Sep. Sci.*, 40, 49-80.
- Zhang, Q.C., Cheng, Y.Y., Li, G.K. y Xiao, X.H. (2015) Porous boronate affinity monolith for on-line extraction coupled to high-performance liquid chromatography for sensitive analysis of heterocyclic aromatic amines in food samples. *Chinese Chem. Lett.*, 26, 1470-1477.
- Zhang, W., Zhang, J., Bao, T., Zhou, W., Meng, J. y Chen, Z. (2013) Universal multilayer assemblies of graphene in chemically resistant microtubes for microextraction. *Anal. Chem.*, 85, 6846-6854.

- Zhao, Q., Li, H., Xu, Y., Zhang, F. y Zhao, L. (2015) Determination triazine pesticides in cereal samples based on single-hole hollow molecularly imprinted microspheres. *J. Chromatogr. A*, 1376, 26-34.
- Zheng, L.Q., Yu, X.D., Xu, J.J. y Chen, H.Y. (2014a) Colorimetric detection of quaternary ammonium surfactants using citrate-stabilized gold nanoparticles (AuNPs) *Anal. Methods*, 6, 2031-2033.
- Zheng, L.Q., Yu, X.D., Xu, J.J. y Chen, H.Y. (2014b) Rapid visual detection of quaternary ammonium surfactants using citrate-capped silver nanoparticles (Ag NPs) based on hydrophobic effect. *Talanta*, 118, 90-95.
- Zhou, Q., Huang, Y. y Xie, G. (2012) Investigation of the applicability of highly order TiO₂ nanotube array for enrichment and determination of polychlorinated biphenyls at trace level in environmental water sample. *J. Chromatogr. A*, 1237, 24-29.
- Zhu, L., Zhu, L. y Lee, H.K. (2001) Liquid-liquid microextraction of nitrophenols with a hollow fiber membrane prior to capillary liquid chromatography. *J. Chormatogr. A*, 924, 407-414.

ANEXOS

A.1 ABREVIATURAS

2-OH-TBA	2-Hidroxi-terbutilazina
AIBN	Azobisisobutironitrilo
APTES	3-(Aminopropil)trimetoxi silano
AQC	Carbamato de 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil
AU	Unidades de absorbancia
BAC	Cloruro de benzalcónio
BAS-Cl	Cloruro de 4-N,N-dimetilamonio-benceno-4'sulfonil
CapLC	Cromatografía de líquidos capilar
CAS	Cromoazurol S
c-CNTS	Nanotubos de carbono carboxilados
CFP	Huella de carbono
CNTs	Nanotubos de carbono
d.i.	Diámetro interno
DAD	Detector de fila de diodos
DDAC	Didecildimetilamonio
DEP	Dietilftalato
DES-TBA	Desetil-terbutilazina
DHEP	Dietilhexilftalato
DLLE	Microextracción líquido-líquido
DOAC	Dioctildimetilamonio
DQO	Demanda química de oxígeno
DVB	Divinilbenceno
FD	Detector de fluorescencia
FFAP	Polietilenglicol modificado con ácido nitrotereftálico
FID	Detector de ionización en llama
GC	Cromatografía de gases
HF-LPME	Microextracción líquida sobre fibra hueca
HILIC	Cromatografía de líquidos de interacción hidrofílica
HPCIM	Método del punto H
HS-SPME	Microextracción en fase sólida en espacio de cabeza
ILs	Líquidos iónicos
IPs	Índice de preconcentración
IT-SPME	Microextracción en fase sólida en tubo
LC	Cromatografía líquida
LLSME	Microextracción líquido-líquido-sólido
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
m/v	Masa/volumen
M1	2-Metiltio-4-terc-butilamoni-6-amino-s-triazina

MASB	Metil-2-(aminosulfonil) benzoato
MEPS	Microextracción en fase sólida en jeringa
MIPs	Polímero de impronta molecular
MOFs	Compuestos metal-orgánico estructurados
MS	Detector de espectrometría de masas
MTEOS	Trimetoxietilsilano
MWCNTs	Nanotubos de carbono de pared múltiple
NanoLC	Nanocromatografía de líquidos
NDVI	Índice diferencial de vegetación normalizado
NPs	Nanopartículas
PAHs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
PDMS	Polidimetilsiloxano
PEEK	Polieteretercetona
PEG	Polietilenglicol
PET	Tereftalato de polietileno
PS-DVB	Poliestireno divinilbenceno
QACs	Compuestos de amonio cuaternario
QAV	Química analítica verde
RAM	Material de acceso restringido
RSD	Desviación estándar relativa
SAC	Sacarina
SBSE	Extracción sobre barra agitadora
SEM	Microscopio electrónico de barrido
SPE	Extracción en fase sólida
SPME	Microextracción en jeringa
SPMTE	Microextracción en fase sólida sobre membrana
SWCNTs	Nanotubos de carbono de pared simple
TBM	Tribenurón-metil
TEOS	Tetraetilortosilicato
tr	Tiempo de retención
TRB-5	Polidimetilsiloxano modificado con 5 % de grupos fenilo
TRB-20	Polidimetilsiloxano modificado con 20 % de grupos fenilo
TRB-35	Polidimetilsiloxano modificado con 35 % de grupos fenilo
TRB-50	Polidimetilsiloxano modificado con 50 % de grupos fenilo
TRZ	2-Metoxi-4-metilamino-6-metil-1,3,5-triazina
ua	Unidades arbitrarias
UE	Unión Europea
UHPLC	Cromatografía de líquidos de ultra alta presión
UV-vis	Ultravioleta-visible
v/v	Volumen/volumen
VPBA	Ácido 4-vinilfenilborónico
γ-MAPS	3-(metacriloxi)propiltrimetoxisilano

A.2 LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Aspectos más importantes de los procedimientos analíticos según la QAV.	4
Figura 2. Representación esquemática de las configuraciones más usadas en IT-SPME-LC: A) en válvula con una bomba, B) carga/expulsión y C) en válvula con dos bombas. En naranja se muestra el capilar de extracción.	10
Figura 3. Representación esquemática de los diferentes tipos de columnas de extracción utilizadas en IT-SPME. A) recubierta, B) monolítica, C) particulada y D) con fibras.	11
Figura 4. Dimensiones de los sistemas de IT-SPME en válvula descritos en la literatura (d.i. vs longitud).	16
Figura 5. Influencia de la longitud del capilar en el tiempo de procesamiento de la muestra, para procedimientos descritos en la literatura.	17
Figura 6. Estructuras alotrópicas del carbono más utilizadas como sorbente: a) grafeno; b) fullereno; c) nanocuernito; d) nanotubo de pared simple; e) nanotubo de pared múltiple.	24
Figura 7. Diagrama de una jeringa para MEPS.	42
Figura 8. Esquema del mecanismo de interacción HILIC.	46
Figura 9. Representación de la superficie de la fase estacionaria ZIC-HILIC (R).	47
Figura 10. Estructuras moleculares de los compuestos de amonio cuaternario estudiados en esta tesis. DOAC: dioctildimetilamonio.	68
Figura 11. Estructura molecular de la clorofila a y la clorofila b.	70
Figura 12. A) Espectrofotómetro UV-vis Carry-60; B) Fibra óptica; C) Sonda de reflexión difusa.	90
Figura 13. Espectrofotómetro Cary 630 FTIR-ATR.	91
Figura 14. Espectrofluorímetro Cary Eclipse.	92
Figura 15. Microscopio óptico ECLIPSE E200LED MV.	93
Figura 16. Microscopio SEM Hitachi S-4800.	94
Figura 17. Sistema de CapLC-DAD, Agilent 1200 Series con bomba binaria. ..	95
Figura 18. Sistema de CapLC-FD, Jasco.	96
Figura 19. Sistema de NanoLC-DAD, Agilent 1200 Series con bomba binaria. ..	97
Figura 20. Montaje de IT-SPME con 1 capilar.	98
Figura 21. Sistema IT-SPME con dos capilares.	101
Figura 22. Fotografía de la jeringa con el material sorbente.	102

Figura 23. Reactor fotoquímico utilizado para el estudio de la degradación del tribenurón-metil.	111
Figura 24. Influencia en el área de pico de: A) el porcentaje de grupos difenilo en la fase TRB; B) el volumen de muestra procesado para una disolución patrón de $2.5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Irgarol®-1051 (amarillo) y $25 \mu\text{g L}^{-1}$ de diurón (azul).	125
Figura 25. A) Cromatograma obtenido a 230 nm para una mezcla de irgarol®-1051 ($2.5 \mu\text{g L}^{-1}$) y diurón ($125 \mu\text{g L}^{-1}$); B) espectro UV del pico correspondiente al diurón; C) espectro del pico del irgarol®-1051.	126
Figura 26. Cromatograma obtenido a 230 nm para la muestra 1. Espectro UV del pico a 8.7 min, correspondiente al irgarol®-1051.	132
Figura 27. Cromatogramas obtenidos al procesar agua nanopura (4 mL + 100 μL) usando diferentes porcentajes de acetonitrilo en la fase móvil, 20 % (azul), 30 % (amarillo), 80 % (gris) y 95 % (morado).	135
Figura 28. Espectros UV normalizados de los picos observados en el cromatograma de la Figura 20. Los espectros corresponden al pico con tr a) 8.3 min, b) 8.7 min, c) 9.0 min, e) 12.1 min; y disoluciones patrón de d) DEP, 9.1 min y f) DEHP, 12.1 min. Fase móvil con 95 % de acetonitrilo (v/v).	137
Figura 29. Áreas de pico obtenidas para cada analito, con las columnas capilares TRB-5 (amarillo), c-SWCNTs-TRB-5 (azul) y c-MWCNTs-TRB-5 (gris). ...	139
Figura 30. Cromatogramas obtenidos a 230 nm al procear 4 mL de agua nanopura (azul) y disolución patrón mezcla de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de 2-OH-TB, $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de DES-TBA, $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de atrazina y propazina y $0.25 \mu\text{g L}^{-1}$ de terbutilazina (amarillo).	140
Figura 31. Cromatogramas obtenidos a 230 nm para dos muestras analizadas de agua de mar (azul y amarillo) y una de agua transición (gris).	143
Figura 32. Espectros IR de los A) c-SWCNTs y B) c-MWCNTs; imágenes SEM de los capilares c) c-SWCNTs-TRB-5 y d) c-MWCNTs-TRB-5.	151
Figura 33. Respuesta analítica de los compuestos heterocíclicos nitrogenados ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) empleando las columnas comerciales y modificadas: TRB-5 (azul), c-SWCNTs-TRB-5 (rojo), c-MWCNTs-TRB-5 (verde), TRB-35 (morado), c-SWCNTs-TRB-35 (gris) y c-MWCNTs-TRB-35 (naranja). Las barras de error representan la desviación estandar para $n = 3$	153
Figura 34. Respuesta analítica para los PAHs con los capilares ensayados: TRB-5 (azul), c-SWCNTs-TRB-5 (amarillo), c-MWCNTs-TRB-5 (gris), TRB-35 (morado), c-SWCNTs-TRB-35 (verde) y c-MWCNTs-TRB-35 (rojo). Las barras de error representan la desviación estándar para $n = 3$	156

- Figura 35.** Áreas de pico obtenidas con los capilares TRB-5 (azul), TRB-35 (amarillo), Carbowax (gris), FFAP (morado), TEOS-MTEOS (verde) y TEOS-MTEOS-SiO₂ (rojo). Concentración de los analitos 200 µg mL⁻¹ n=3. 162
- Figura 36.** Cromatogramas obtenidos a 230 nm para disoluciones patrón de a) iodosulfurón-metil, tritosulfurón, tribenurón-metil y triflusulfurón-metil (100 µg L⁻¹) y b) metribuzina, irgarol®-1051, bifenox y cipermetrina (25 µg L⁻¹) 166
- Figura 37.** Cromatogramas obtenidos a 230 nm para una muestra de agua (azul) y la misma muestra fortificada (amarillo) con metribuzina, irgarol®-1051, bifenox (25 µg L⁻¹) y cipermetrina (125 µg L⁻¹). 168
- Figura 38.** Cromatogramas obtenidos a 230 nm para un extracto de una muestra de suelo (azul) y la misma muestra fortificada (rojo) con metribuzina, irgarol®-1051, bifenox (25 ng g⁻¹) y cipermetrina (125 ng g⁻¹). 169
- Figura 39.** Efecto del volumen de muestra en la señal analítica obtenida al procesar A) sacarina (125 µL mL⁻¹), B) naftaleno (20 µg mL⁻¹) y C) fluoranteno (1 µg mL⁻¹) empleando los capilares TRB-35 (azul), FFAP (amarillo), PS-DVB (gris), TEOS-MTEOS (morado) y TEOS-MTEOS-SiO₂ (verde) n =3. 173
- Figura 40.** Cromatogramas obtenidos para: A) tres inyecciones sucesivas de de una disolución estandar de 2.5 µg mL⁻¹ de naftaleno y 0.18 µg mL⁻¹ de fluoranteno; B) muestra de agua nanopura (azul), agua de de acequia (amarillo), agua de río (gris), suelo (morado) y suelo fortificado con naftaleno y fluoranteno (verde). Volumen de muestra 200 µL. 177
- Figura 41.** Fases y dimensiones de las configuraciones de IT-SPME utilizadas en esta tesis. En sombreado las configuraciones de NanoLC. 181
- Figura 42.** Señal analítica obtenida al procesar 1 ng de triazina por el sistema IT-SPME acoplado a A) NanoLC; B) CapLC, usando como fase de extracción los capilares TEOS-MTEOS-SiO₂ (azul), TEOS-MTEOS (amarillo), TRB-5 (gris), c-SWCNTs-TRB-5 (morado), c-MWCNTs-TRB-5 (verde), TRB-35 (rojo), c-SWCNTs-TRB-35 (turquesa) y c-MWCNTs-TRB-35 (naranja) n=3. 183
- Figura 43.** Cromatogramas obtenidos a 230 nm con las fases TEOS-MTEOS-SiO₂ (gris), TEOS-MTEOS (amarillo) y TRB-5 (azul). 186
- Figura 44.** Microfotografías SEM de columnas capilares recubiertas de TEOS-MTEOS (A y B) y TEOS-MTEOS-SiO₂ (C). 187
- Figura 45.** Señal analítica obtenida para desetil-terbutilazina, terbutilazina e irgarol®-1051 empleando capilares recubiertos con TEOS-MTEOS-SiO₂ con diferente concentración de NPs: 0 mg mL⁻¹ (azul), 0.05 mg mL⁻¹ (amarillo), 1.5 mg mL⁻¹ (gris), 5 mg mL⁻¹ (morado) y 10 mg mL⁻¹ (verde) n=3. 188

- Figura 46.** Variación del área de pico obtenida empleando TEOS-MTEOS-SiO₂ para la extracción de una disolución de 25 µg mL⁻¹ de DES-TBA (azul) y 2.5 µg mL⁻¹ de terbutilazina (amarillo) e irgarol®-1051 (gris). A) volumen de muestra; B) volumen de agua en la etapa de lavado. 189
- Figura 47.** Cromatogramas obtenidos para una muestra de A) agua de transición y B) estruvita. Muestra (amarillo), muestra fortificada con desetil-terbutilazina (2 µg L⁻¹), terbutilazina e irgarol®-1051 (0.25 µg L⁻¹) (gris) y muestra positiva en irgarol®-1051 (morado). En azul se muestran los espectros de absorción UV de los picos correspondientes a analitos e interferentes. 194
- Figura 48.** Variación del área de pico según el volumen de muestra procesado por el capilar de TEOS-MTEOS-TiO₂. Fluometurón (azul), linurón (amarillo), fentión (gris), metobromurón (morado), fenamifós (verde), isoproturón (rojo), fenitrotión (turquesa) y bifenox (naranja). 197
- Figura 49.** Áreas de pico obtenidas con los capilares de TEOS-MTEOS dopados con NPs de SiO₂ (azul) y TiO₂ (amarillo). 198
- Figura 50.** Imágenes SEM de capilares de TEOS-MTEOS dopados con NPs de: A y B) TiO₂ y C) TiO₂ y CuO (una dispersión de 0.025 mg mL⁻¹ de cada una). 200
- Figura 51.** Cromatogramas obtenidos a 230 nm al procesar 500 µL de agua nanopura por los diferentes capilares de TEOS-MTEOS dopado con las NPs ensayados. Los recubrimientos con NPs de Ag y Au se prepararon a partir de dispersiones de 20 nm y 40 nm de tamaño, respectivamente. 201
- Figura 52.** Cromatogramas obtenidos a 230 nm para una disolución patrón de iodosulfurón-metil (25 µg L⁻¹), desetil-terbutilazina (20 µg L⁻¹) e irgarol®-1051 (2.5 µg L⁻¹) empleando capilares recubiertos TEOS-MTEOS sin modificar (azul) y modificado con NPs de Ag de 20 nm (gris) y NPs de Au de 40 nm (amarillo), ambas estabilizadas en tampón citrato. 202
- Figura 53.** Variación del área de pico en función del contenido de NPs de TiO₂ usado en la síntesis de la fase de extracción. 25 µg L⁻¹ de iodosulfurón-metil (azul), tritosulfurón (amarillo) y metribuzina (morado); 20 µg L⁻¹ de desetil-terbutilazina (verde), 10 µg L⁻¹ de tribenurón-metil (gris), 5 µg L⁻¹ de triflusulfurón-metil (rojo) y 2.5 µg L⁻¹ de terbutilazina (turquesa) e irgarol®-1051 (naranja). 208
- Figura 54.** Cromatogramas obtenidos a 230 nm para una disolución patrón mezcla de tritosulfurón (25 µg mL⁻¹), metribuzina (25 µg mL⁻¹) y triflusulfurón-metil (5 µg mL⁻¹) empleando un capilar de TEOS-MTEOS dopado con NPs de TiO₂, de CuO y una mezcla de ambos, y el sistema con dos capilares acoplados en serie. 209
- Figura 55.** Fotografía de la válvula de inyección automática de 10 puertos con los dos capilares de extracción acoplados en serie. 210

Figura 56. Cromatogramas obtenidos a 230 nm con la configuración de dos capilares acoplados para una muestra de agua de mar (azul), la misma muestra fortificada con tritosulfurón ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$) y triflusulfurón-metil ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) (amarillo) y con iodosulfurón-metil ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$), desetil-terbutilazina ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) e irgarol®-1051 ($2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) (gris). 213

Figura 57. A) Cromatogramas obtenidos a 230 nm con la configuración de dos capilares acoplados en serie para dos muestras de agua positivas en terbutilazina. B) Espectros UV normalizados de los picos sospechosos de ser terbutilazina en los cromatogramas de A y para una disolución patrón de este compuesto ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$). 213

Figura 58. Mecanismo de degradación del TBM y espectro de absorción normalizado del pico identificado como TRZ (azul) y las triazinas atrazina (amarillo) y terbutilazina (gris). 215

Figura 59. A) Cromatogramas obtenidos a 230 nm para una disolución de TBM ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) expuesta a condiciones de laboratorio durante diferentes días; B) representación del Ln del porcentaje de TBM no degradado frente al tiempo de exposición para dos disoluciones patrón de TBM de concentración $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (azul) y $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (rojo). 218

Figura 60. Cromatogramas obtenidos a 230 nm para A) una disolución de TBM ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) después de ser expuesta a radiación UV; B) una disolución de TBM de concentración $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ preparada en agua nanopura a pH 6.5, 5.3 y 3.0 y para otra disolución de concentración $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ a pH 3. 219

Figura 61. Cromatogramas registrados a 230 nm para diferentes muestras de agua ambientales y agua de acequia fortificada con TBM ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) antes y después de ser expuesta a condiciones de laboratorio durante 14 días. 222

Figura 62. Representación del porcentaje de TBM no degradado frente al tiempo de exposición para diferentes tipos de muestras de agua fortificadas con TBM a un nivel de concentración de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ 223

Figura 63. Espectro de absorción de los soportes de nylon con diferente concentración de clorofila a retenida. A) 314 mg m^{-2} , B) 236 mg m^{-2} , C) 157 mg mL^{-2} y D) 79 mg m^{-2} 227

Figura 64. A) espectro de reflectancia difusa para la muestra (amarillo) y el analito a la concentración máxima posible (azul); B) K_i calculada para tres disoluciones patrón de clorofila a (79 , 157 y 314 mg m^{-2}); C) Gráfico $S_{500} - K_i S_1$ frente a la longitud de onda i , para los K_i calculados en B. 229

- Figura 65.** Algunos espectros de interferencias desconocidas (A, muestra; E, muestra menos analito a la máxima concentración permitida; y_{ref} entre 1.05 y 0.8 ua). Localización del par de longitudes de onda con la misma señal independientemente de las condiciones. 231
- Figura 66.** Espectros para una muestra de hoja de espinaca antes y después de aplicar el método HPCIM. Muestra directa (gris), interferente (amarillo) y clorofila a en la muestra (azul). 232
- Figura 67.** Espectro de absorción de los extractos de etanol para dos hojas de espinacas diferentes. 234
- Figura 68.** Espectros de absorción de las hojas de espinacas tratadas con terbutilazina antes y después de aplicar el método HPCIM. Muestra medida directamente (gris), interferencia (amarillo) y clorofila a (azul). A) zona de hoja poco afectada, B) zona de hoja más afectada. 236
- Figura 69.** Gráficos del contenido de clorofila a obtenidos por el método HPCIM (A) y del índice de reflectancia obtenido con NDVI (B) y Macc01 (C). Hojas sin tratar (B1 y B2) y tratadas (S1-S6). 238
- Figura 70.** Áreas de pico obtenidas al procesar diferentes volúmenes de disolución patrón de tirosina (azul) y triptófano (amarillo) de concentración $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. 242
- Figura 71.** Espectros de absorción de A) una disolución de ovoalbúmina de concentración $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (amarillo) y una mezcla de triptófano y tirosina (azul); B) la misma disolución de ovoalbúmina a pH básico (morado) y neutro (gris). ... 244
- Figura 72.** Espectro de emisión para una disolución de ovoalbúmina de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ a pHs 7 (amarillo) y 13 (azul). 246
- Figura 73.** A) Cromatogramas obtenidos a 230 nm para la muestra hidrolizada (gris), muestras sin hidrolizar (amarillo) y disolución patrón de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de triptófano y $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ de tirosina (azul). Espectros UV normalizados de B) triptófano y C) tirosina. 247
- Figura 74.** SEM micrographs of A, C) capillary 2; B) capillary 1; D) capillary 3; E) capillary 9. 252
- Figura 75.** Images obtained by optic microscopy for A) column 2; B) column 3; C) column 4; D) columns 6; E) columns 7; F) column 9. 254
- Figura 76.** Peak area obtained using TEOS-MTEOS-TiO₂ (blue), column 2 (yellow) and, column 9 (gray) as extractive phase for 500 μL of stock solutions of iodosulfuron-methyl ($20 \mu\text{g L}^{-1}$), tribenuron-methyl, fenthion, fenitrothion and bifenoxy ($10 \mu\text{g L}^{-1}$), tritosulfuron ($5 \mu\text{g L}^{-1}$), desethyl-terbuthylazine ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) and metribuzine, terbuthylazine and irgarol®-1051 ($2.5 \mu\text{g L}^{-1}$). 255

- Figure 77.** Chromatograms obtained at 230 nm when processing 500 μL of water using column 2 (blue) and column 9 (yellow) for IT-SPME. 257
- Figure 78.** A) Variation of peaks areas with the sample volume for solutions of 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ of metribuzin (blue) and irgarol®-1051 (gray), 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ of iodosulfuron-methyl (yellow) and tritosulfuron (purple) and 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ of desethyl-terbuthylazine (green); B) Chromatograms obtained at 230 nm when processing 500 μL (blue) and 2 mL (yellow) of stock solution of 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ of terbuthylazine and 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ of fenitrothion and fenthion. 258
- Figura 79.** A) Estructura de la celulosa; B) representación de las interacciones entre la celulosa y los QACs ($R_1R_2R_3R_4N^+$) 262
- Figura 80.** Espectros de absorción obtenidos para A) una disolución de CAS-AI (azul) y CAS-AI en presencia de 3.62 mg L^{-1} (amarillo) y 9.05 mg L^{-1} (gris) de DDAC; B) disolución patrón de DDAC de concentración 36.2 mg L^{-1} procesada por el método de papel (morado) e hisopo de algodón (verde). 264
- Figura 81.** Influencia en la absorbancia de los parámetros: A) tiempo de muestreo; B) tiempo de reacción; C) estabilidad en el tiempo medidas para una disolución patrón de DDAC de concentración 18.1 mg L^{-1} 265
- Figura 82.** Espectros de absorción UV para: A) una disolución de 18.4 mg L^{-1} de BAC (gris), 18.1 mg L^{-1} de DDAC (amarillo) y 15.3 mg L^{-1} de DOAC (azul); B) diferentes disoluciones patrón de DDAC; C) imágenes de los hisopos medidos en B; D) representación de la carta de colores. Concentraciones: P_0 blanco, P_1 3.62 mg L^{-1} , P_2 9.05 mg L^{-1} , P_3 18.1 mg L^{-1} , P_4 27.2 mg L^{-1} y P_5 36.2 mg L^{-1} 267
- Figura 83.** Imágenes de los hisopos obtenidos al muestrear: disoluciones individuales de A) 18.1 mg L^{-1} de DDAC, B) 21.6 mg L^{-1} de SDS, C) efluente positivo en QACs, D) efluente negativo en QAC; superficies de 1 cm^2 de E) vidrio con 3.5 μg de DDAC y F) la misma superficie después de E; G) vidrio sin QACs (blanco) y superficie de vidrio fortificada con 3.6 $\mu\text{g cm}^{-2}$ de DDAC de área: H) 1 cm^2 , I) 2 cm^2 , J) 4 cm^2 271
- Figura 84.** Espectro de absorción UV de una disolución patrón de BAC de 2.5 mg L^{-1} (amarillo) y 5 mg L^{-1} (gris) y las disoluciones procesadas por IT-SPME de agua nanopura (azul), BAC 2.5 mg L^{-1} (morado) y DDAC 5 mg L^{-1} (verde). 273
- Figura 85.** Espectros de absorción UV para una disolución patrón de 200 mg L^{-1} de BAC (amarillo), dos réplicas de la misma disolución tratada con cenizas (morado y gris), y agua nanopura (azul). 281

Figura 86. A) Espectros de absorción obtenidos al tratar una disolución de BAC de concentración 5 mg L^{-1} con 10 mg (azul) y 20 mg (amarillo) de cenizas; B) Influencia en la absorbancia del volumen de disolución de BAC (200 mg L^{-1}) procesado por el dispositivo MEPS propuesto, ($n=3$). 283

Figura 87. Espectro de absorción UV obtenido para una muestra de detergente (azul) y para la misma muestra procesada por el sistema MEPS propuesto (amarillo). 284

A.3 LISTADO DE TABLAS







Tabla 1. Clasificación general de sistemas de LC según las dimensiones de la columna y el flujo de fase móvil.	6
Tabla 2. Ejemplos de aplicación de diferentes procedimientos basados en LC miniaturizada.	7
Tabla 3. Huella de carbono estimada para las diferentes configuraciones de IT-SPME combinadas con el mismo sistema de LC y detector DAD.	17
Tabla 4. Ejemplos de aplicación de diferentes procedimientos basados en sistemas de LC miniaturizada con columnas de GC para IT-SPME.	20
Tabla 5. Procedimientos de HILIC-NanoLC descritos en la literatura.	49
Tabla 6. Clasificación de las principales familias de pesticidas y sus aplicaciones.	51
Tabla 7. Estructura y log Kow de las triazinas y productos de degradación estudiados.	54
Tabla 8. Estructura y log Kow de las sulfonilureas estudiadas.	56
Tabla 9. Estructura y log Kow de los pesticidas organofosforados estudiados.	58
Tabla 10. Estructura química y log Kow de los pesticidas tipo fenilurea estudiados.	60
Tabla 11. Estructura y log Kow de los pesticidas bifenox, trifluralina, piriproxifeno y cipermetrina.	61
Tabla 12. Estructura y log Kow de los PAHs estudiados en esta tesis.	64
Tabla 13. Estructura y log kow de los aminoácidos triptófano y tirosina.	67
Tabla 14. Listado de reactivos, casa comercial y pictogramas de seguridad  Inflamable,  corrosivo,  tóxico,  efectos adversos en dosis altas,  peligroso para la salud,  peligroso para el medio ambiente. 1) Sigma: Sigma-Aldrich; Dr. Ehrenst: Dr Ehrenstorfer.	87
Tabla 15. Condiciones cromatográficas de los procedimientos utilizados en CapLC.	107
Tabla 16. Condiciones cromatográficas de los procedimientos utilizados en NanoLC.	109
Tabla 17. Tipo de muestras utilizadas y analitos/ usos buscados en cada una.	116

Tabla 18. Parámetros analíticos obtenidos para la determinación de irgarol®-1051 y diurón.	127
Tabla 19. Procedimientos descritos en bibliografía para la determinación en muestras de agua de irgarol®-1051 y diurón.	129
Tabla 20. Resultados obtenidos en el análisis de las muestras y estudios de recuperación utilizando IT-SPME-CapLC-DAD.	131
Tabla 21. Precisión (RSD, %) obtenida al procesar una mezcla de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de los analitos con las columnas de extracción estudiadas ($n = 3$).	138
Tabla 22. Parámetros analíticos obtenidos con el método propuesto.	142
Tabla 23. Resultados obtenidos en el estudio del efecto matriz y de la exactitud.	145
Tabla 24. Métodos propuestos para el análisis de triazinas en muestras de agua que hacen uso de técnicas de microextracción.	147
Tabla 25. LODs obtenidos con las diferentes fases de extracción estudiadas para todos los analitos seleccionados.	154
Tabla 26. IPs obtenidos para todos los analitos.	158
Tabla 27. IPs calculados respecto a la fase TRB-5.	164
Tabla 28. Parámetros analíticos obtenidos con la columna TEOS-MTEOS-SiO ₂	167
Tabla 29. Recuperaciones obtenidas para una muestra de aguade mar.	169
Tabla 30. Precisión obtenida empelando capilares recubiertos de TEOS-MTEOS funcionalizados con NPs de SiO ₂ y TiO ₂ y el capilar comercial que mejor factor de extracción proporciona para cada compuesto ($n=3$); volumen de muestra 200 μL	176
Tabla 31. Parámetros operativos para los sistemasIT-SPME-NanoLC y IT-SPME-CapLC.	180
Tabla 32. Precisión (expresada como RSD) para el mismo capilar y capilares de diferentes síntesis recubiertos con la fase de TEOS-MTEOS y TEOS-MTEOS-SiO ₂ $n=3$	190
Tabla 33. Parámetros analíticos obtenidos empleando como fase de extracción.	191
Tabla 34. LODs obtenidos para triazinas y productos de degradación con diferentes procedimientos descritos en la bibliografía.	192
Tabla 35. IPs obtenidos empleando TEOS-MTEOS modificado con NPs de Au y Ag.	203
Tabla 36. IP sobtenidos empleando TEOS-MTEOS modificado con NPs de óxidos metálicos.	204

Tabla 37. LODs y RSD para los capilares de TEOS-MTEOS dopados con NPs de TiO_2 y CuO , y para ambos capilares acoplados en serie.	211
Tabla 38. Precisión entre capilares ($n=3$).	212
Tabla 39. Parámetros analíticos obtenidos para TBM y MASB con el método IT-SPME-NanoLC-DAD propuesto.	217
Tabla 40. Parámetros fisicoquímicos de las muestras estudiadas.	221
Tabla 41. Resultados obtenidos del estudio de degradación de TBM en aguas ambientales.	223
Tabla 42. Rectas de calibrado para la cuantificación de clorofila <i>a</i> inmovilizada en los soportes de nylon (calibrado de 4 puntos).	227
Tabla 43. Valores promedios de absorción y RSD tomados en diferentes puntos de la misma hoja de espinaca ($n=20$).	228
Tabla 44. Concentración de clorofila <i>a</i> determinada por el método HPCIM para plantas tratadas con diversos pesticidas. B1 y B2 hojas de planta sin tratar y S1-S6 hojas de planta tratada. Las medidas se realizaron 31 días después del tratamiento con trifluralina y clorpirifós y 21 días después del tratamiento con terbutilazina.	237
Tabla 45. Métodos de determinación de clorofila <i>a</i> en muestras vegetales.	239
Tabla 46. Parámetros analíticos obtenidos mediante el método HILIC-IT-SPME-NanoLC-DAD propuesto.	243
Tabla 47. Parámetros analíticos obtenidos con los procedimientos espectroscópicos.	245
Tabla 48. Resultados obtenidos con los procedimientos espectroscópicos.	248
Tabla 49. Diferentes procedimientos descritos en la literatura para la determinación de triptófano y tirosina	250
Table 50. Conditions used for the synthesis of the new monolithic sorbent and permeability of the resulting columns.	253
Table 51. LODs obtained by using as extractive phase VPBA-DVB and TEOS-MTEOS doped with TiO_2 and SiO_2 NPs polymers.	259
Tabla 52. Parámetros analíticos obtenidos para los QACs ensayados.	268
Tabla 53. Diferencias entre la absorbancia medidas para una disolución mezcla de QACs y la medida para disoluciones individuales ($n=6$).	269
Tabla 54. Incertidumbres parciales asociadas a los resultados (expresado como desviación estándar relativa) para dos concentraciones de DDAC e incertidumbre combinada y expandida ($k=2$); concentraciones $\pm U$ ($k=2$) calculadas con el método propuesto.	270

Tabla 55. Principales características de los métodos colorimétricos propuestos para la determinación de QACs.	276
Tabla 56. Principales ventajas e inconvenientes de las técnicas propuestas para el análisis de QACs	278
Tabla 57. Parámetros analíticos para los dos métodos comparados.....	284
Tabla 58. Resultados obtenidos al aplicar el procedimiento de valoración con tampón acetato de la suspensión de las cenizas en agua y el método propuesto de ajuste in-situ del pH.	285
Tabla 59. Recuperaciones obtenidas aplicando el procedimiento de ajuste del pH in-situ con 2-nitrofenol. Se muestran los valores para cada una de las 2 réplicas.	286
Tabla 60. Parámetros de las rectas del método de adición estándar ($n = 6$, cantidad de hierro encontrada en cada muestra.....	287

A.4 CONTRIBUCION DEL DOCTORANDO EN LAS PUBLICACIONES

1. Moliner-Martínez, Y., **Serra-Mora, P.**, Verdú-Andrés, J., Herráez-Hernández, R. y Campíns-Falcó P. (2015) Analysis of polar triazines and degradation products in waters by in-tube solid-phase microextraction and capillary chromatography: an environmentally friendly method. *Anal. Bioanal. Chem.*, 407, 1485-1497. Factor Impacto (JCR 2018): 3.286. **Contribución 100 %.**
2. Jornet-Martínez, N., **Serra-Mora, P.**, Moliner-Martínez, Y., Herráez-Hernández, R. y Campíns-Falcó, P. (2015) Evaluation of carbon nanotubes functionalized polydimethylsiloxane based coatings for in-tube solid phase microextraction coupled to capillary liquid chromatography. *Chromatography*, 2, 515-528. **Contribución 50 %.**
3. **Serra-Mora, P.**, Moliner-Martínez, Y., Herráez-Hernández, R., Verdú-Andrés, J. y Campíns-Falcó, P. (2016) Simplifying iron determination with o-phenantroline in food ashes using 2-nitrophenol as an acid-base indicator. *Food Anal. Methods*, 9, 1150-1154. Factor Impacto (JCR 2018): 2.413. **Contribución 100 %.**
4. Pla-Tolós, J., **Serra-Mora, P.**, Hakobyan, L., Molins-Lagua, C., Moliner-Martínez, Y. y Campíns-Falcó, P. (2016) A sustainable on-line CapLC method for quantifying antifouling agents like irgarol-1051 and diuron in water samples: estimation of the carbon footprint. *Sci. Total Environ.*, 569-570, 611-618. Factor Impacto (JCR 2018): 5.589. **Contribución 33 %.**
5. **Serra-Mora, P.**, Jornet-Martínez, N., Moliner-Martínez, Y. y Campíns-Falcó, P. (2017) In tube-solid phase microextraction-nano liquid chromatography: application to the determination of intact and degraded polar triazines in waters and recovered struvite. *J. Chromatogr. A*, 1513, 51-58. Factor Impacto (JCR 2018): 3.858. **Contribución 100 %.**

6. Muñoz-Ortuño, M., **Serra-Mora, P.**, Herráez-Hernández, R., Verdú-Andrés, J. y Campíns-Falcó, P. (2017) A new tool for direct non-invasive evaluation of chlorophyll a content from diffuse reflectance measurements. *Sci. Total Environ.*, 609, 370-376. Factor Impacto (JCR 2018): 5.589. **Contribución 75 %.**
7. **Serra-Mora, P.**, Moliner-Martínez, Y., Molins-Legua, C., Herráez-Hernández, R., Verdú-Andrés, J. y Campíns-Falcó, P. (2017). Trends in online Intube solid phase microextraction. En E. Ibañez y A. Cifuentes (ed), *Green extraction techniques: principles, advantages and applications*, volume 76, 10st edition (pp 427-461), Ámsterdam, Holanda: Elsevier. **Contribución 100 %.**
8. Moliner-Martínez, Y., **Serra-Mora, P.**, Verdú-Andrés, J., Molins-Legua, C., Herráez-Hernández, R. y Campíns Falcó, P. (2017). Application of nanomaterials in solid and liquid microextraction. En M. Valcárcel, S. Cárdenas y R. Lucena (ed), *Analytical microextraction techniques* (pp 135-166), Sharjah, Emiratos Árabes Unidos: Bentham Science Publishers. **Contribución 100 %.**
9. **Serra-Mora, P.**, Muñoz-Ortuño, M., Gallego-Prieto, P., Verdú-Andrés, J., Herráez-Hernández, R. y Campíns-Falcó, P. (2018) Cotton swabs supported in-situ assay for quaternary ammonium compounds residues in effluents and surfaces. *Food Control*, 84, 419-428. Factor Impacto (JCR 2018): 4.248. **Contribución 100 %.**
10. **Serra-Mora, P.**, Rodríguez-Palma, C.E., Verdú-Andrés, J., Herráez-Hernández, R. y Campíns-Falcó, P. (2018) Improving the on-line extraction of polar compounds by IT-SPME with silica nanoparticles modified phases. *Separations*, 5, 10. **Contribución 100 %.**
11. Campíns-Falcó, P., Herráez-Hernández, R. y **Serra-Mora, P.** (2018). Liquid chromatography-instrumentation. En P. Worsfold, A. Townshend y C. Poole (ed), *Encyclopedia of Analytical Science 2nd edition* (pp 205-213), Ámsterdam, Holanda: Elsevier. **Contribución 100 %.**
12. **Serra-Mora, P.**, García-Narbona, P., Verdú-Andrés, J., Herráez-Hernández, R. y Campíns-Falcó, P. (2019) Exploring new extractives phases for in-tube solid phase microextraction coupled to miniaturized liquid chromatography. *Separations*, 6, 12. **Contribución 100 %.**

13. **Serra-Mora, P.**, Herráez-Hernández, R. y Campíns-Falcó, P. Bimodal copper oxide nanoparticles doped phase for extraction of highly polar compounds by in-tube solid-phase microextraction coupled on-line nano-liquid chromatography. Enviado. **Contribución 100 %.**
14. **Serra-Mora, P.**, Herráez-Hernández, R. y Campíns-Falcó, P. Minimizing the impact of sample preparation on analytical results by on-line coupled in-tube solid phase microextraction and nano-liquid chromatography: study of the degradation of tribenuron-methyl in environmental waters. Pendiente de envío. **Contribución 100 %.**

